

VSEBINA

POVZETEK	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	4
1.1 ACE INHIBITORJI.....	4
1.1.1 DELOVANJE RENIN – ANGIOTENZIN – ALDOSTERONSKEGA SISTEMA (RAAS)	4
1.1.2 ENCIM ANGIOTENZIN KONVETRAZA	5
1.1.3 STRUKTURA IN DELOVANJE ACE INHIBITORJEV	6
1.2 ANALITSKA PODPORA STABILNOSTNIM ŠTUDIJAM.....	8
1.2.1 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC).....	9
1.2.2 MASNA SPEKTROMETRIJA	16
2 NAMEN DELA	21
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 MATERIALI	22
3.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI IN TOPILA	22
3.1.2 ACE INHIBITORJI VKLJUČENI V STABILNOSTNO ŠTUDIJO	23
3.1.3 NAPRAVE IN PRIBOR.....	25
3.2 METODE	27
3.2.1 UPORABA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI.....	27
3.2.2 UPORABA MASNE SPEKTROMETRIJE	34
3.2.3 OBDELAVA PODATKOV	35
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	36
4.1 OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE	36
4.2 ŠTUDIJA STABILNOSTI RAZVOJNEGA »PRILA«	44
4.2.1 VPLIV <i>pH</i> IN TEMPERATURE.....	44
4.2.2 DOLOČITEV REDA IN KINETIKE REAKCIJE	48
4.3 DOLOČITEV MEHANIZMA RAZPADA RAZVOJNEGA »PRILA«	51
4.4 IZSLEDKI ŠTUDIJ NA NEKATERIH ACE INHIBITORJIH	56
4.5 PRIMERJAVA ACE INHIBITORJEV	58
4.5.1 VPLIV <i>pH</i> NA RAZPAD	58
4.5.2 VPLIV TEMPERATURE NA RAZPAD.....	63
5 ZAKLJUČEK	65
6 LITERATURA	66
PRILOGE	70

POVZETEK

Testiranje stabilnosti je pomemben del razvoja in proizvodnje zdravilnih učinkovin in izdelkov, saj zagotavlja podatke, ki so bistvenega pomena za kakovost, varnost in učinkovitost. Pomembno vlogo pri stabilnosti ima tudi struktura molekule, ki pa je ključnega pomena za aktivnost učinkovine. Najpogosteje uporabljena analizna tehnika v stabilnostnih študijah je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. Zaradi raznolikosti lastnosti učinkovin in razpadnih produktov je pomemben izbor pravega tipa tekočinske kromatografije. V namen identifikacije razpadnih produktov je pogosto uporabljena masna spektrometrija sklopljena s HPLC, t.i. LC-MS.

V sklopu eksperimentalnega dela smo najprej razvili HPLC metodo, ki je omogočila zadostno ločitev komponent preiskovanega vzorca ter s tem odvzem frakcij, ki smo jih uporabili v MS analizi. Na ta način smo identificirali razpadne produkte in predvideli mehanizem razpada razvojnega »prila«. V nadaljevanju smo razvili stabilnostno indikativno HPLC metodo, ki je omogočala kvantitativno določitev vsebnosti razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov – produkta hidrolize in intraciklizacije. Analizno metodo smo validirali.

V stabilnostni študiji smo spremljali stabilnost vodne raztopine razvojnega »prila« pri različnih pogojih (pH 2,0, 6,8 in 12,0 ter temperaturah 40, 60 in 80 °C) in tako preverili vpliv pH in temperature na obseg in hitrost razgradnje. Ugotovili smo, da se z višanjem pH in temperature vsebnost razvojnega »prila« vse hitreje zmanjšuje ter da v kisli raztopini nastajata rLAT in rDKP, v nevtralnem predvsem rLAT, v bazičnem pa nastaja le rLAT.

Na enak način je bila določena stabilnost izbranih ACE inhibitorjev, ki smo jih vključili v primerjavo. Na podlagi primerjave rezultatov stabilnostne študije razvojnega »prila« in predhodno izvedenih stabilnostnih študij na ACE inhibitorjih smo ocenili ne le vpliv okolja na stabilnost temveč tudi vpliv strukture na stabilnost ACE inhibitorjev.

Ugotovili smo, da aromatski obroč usmerja razpad v smeri intraciklizacije in nastanka DKP, biciklična struktura pa v smeri hidrolize in nastanka prilata. Najhitreje razpadajo ACE inhibitorji s prolinskim obročem v strukturi in počasneje tisti, ki vsebujejo biciklični derivat prolina. Vpliv temperature na hitrost razpada je pri vseh enak: z višanjem temperature potekata reakciji hidrolize in intraciklizacije hitreje. Nastanek prilata je bolj odvisen od temperature, medtem ko je nastanek DKP bolj odvisen od pogojev (pH).

SEZNAM OKRAJŠAV

ACE	Angiotensin Converting Enzyme; encim angiotenzin konvertaza
ACN	acetonitril
AT 1	receptor za angiotenzin II
DKP	diketopiperazin, produkt intraciklizacije ACE inhibitorja
Ea	aktivacijska energija
FA	mravljična kislina
FDA	Food And Drug Administration; ameriška Agencija za hrano in zdravila
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
k	hitrostna konstanta reakcije
rLAT	produkt hidrolize razvojnega »prila« – razvojni prilat
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass spectrometry; tekočinska kromatografija – masna spektrometrija
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
Pro	aminokislina prolin
r^2	determinacijski koeficient
rDKP	produkt intraciklizacije razvojnega »prila« – razvojni DKP
RP-HPLC	reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
SF	stacionarna faza
TEA	trietilamin
TFA	trifluoroocetna kislina
t_r	retencijski čas
UV-VIS	ultraviolet-visible; ultravijolično-vidno
λ	lambda (oznaka za valovno dolžino)

1 UVOD

1.1 ACE INHIBITORJI

Zaviralci angiotenzin konvertaze oziroma ACE (angiotensin-converting enzyme) inhibitorji spadajo v skupino antihipertenzivno delujočih učinkovin, ki delujejo na t.i. renin-angiotenzin-aldosteronski sistem.

1.1.1 DELOVANJE RENIN – ANGIOTENZIN – ALDOSTERONSKEGA SISTEMA (RAAS)

RAAS je eden izmed pomembnejših mehanizmov uravnavanja volumna krvi ter s tem krvnega tlaka. Spada med srednjeročne mehanizme, saj deluje znotraj nekaj minut do ur.

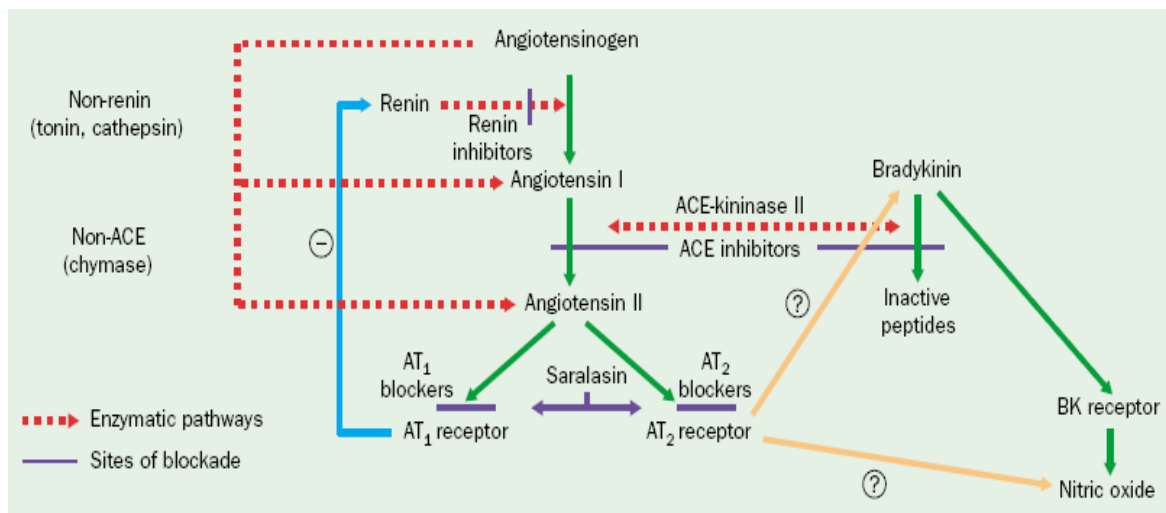
Renin je proteolitični encim ledvic, ki se izloča ob zmanjšanem intrarenalnem arterijskem tlaku ali pa ob zmanjšanem vnosu natrijevih in kloridnih ionov. Renin deluje na v plazmi prisoten globulin angiotenzinogen, od katerega odcepi dekaeptid, imenovan angiotenzin I. Ta sam po sebi nima fizioloških učinkov, je le substrat za encim angiotenzin konvertaza, ki je odgovoren za pretvorbo angiotenzina I v angiotenzin II. Konvertaza odcepi dve N-terminalni aminokislini, nastane oktaeptid angiotenzin II. Angiotenzin II deluje preko vezave na AT 1 receptorje močno vazokonstriktorno, stimulira pa tudi izločanje aldosterona, kar vpliva na resorpcijo Na^+ in izločanja K^+ skozi ledvične tubule. Posledica je zvišan volumen ekstracelularne tekočine in s tem zvišanje krvnega tlaka.

Angiotenzin II se naprej metabolizira v jetrih in ledvicah. Aminopeptidazi A in N z N-konca oktaeptida zaporedoma odstranita po eno aminokislino in tako nastaneta angiotenzin III in IV. Prvi, angiotenzin III, stimulira sekrecijo aldosterona in preko delovanja na osrednji živčni sistem povzroča občutek žeje. Angiotenzin IV naj bi stimuliral sproščanje inhibitorja plazminogenskega aktivatorja I iz endotelija, vendar ta funkcija še ni povsem pojasnjena. (1,2)

Poleg tega ACE inaktivira bradikinin, kar je pomembno pri razumevanju farmakoloških učinkov ACE inhibitorjev.

Angiotenzin I lahko nastaja tudi v odsotnosti renina s pomočjo encimov tonina ali katepsina; prav tako lahko v odsotnosti ACE nastaja angiotenzin II ob pomoči tripsina, katepsina ali kimaze v srcu. Mehanizmi niso poznani. Poznavanje tega dejstva nam

omogoča razlago zakaj je angiotenzin II pri dolgotrajni ACE inhibiciji še vedno v nizkih koncentracijah prisoten v plazmi. Poti nastanka in razpada angiotenzina II prikazuje Slika 1. (3)



Slika 1: Renin-angiotenzin-aldosteronski sistem (RAAS) (3)

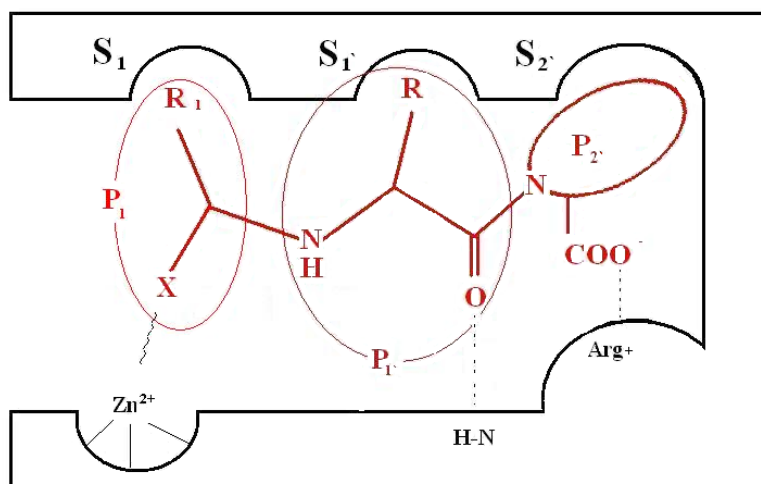
1.1.2 ENCIM ANGIOTENZIN KONVETRAZA

ACE spada med metalopeptidaze, saj ima v aktivnem mestu vezan dvovalentni cink (Zn^{2+}), okoli njega pa so razporejeni trije hidrofobni prostori: S_1' , S_2' in S_1 . (4)

Naravni substrat angiotenzin I ($X - Phe_8 - His_9 - Leu_{10}$) se v aktivno mesto ACE encima veže tako, da se zadnje tri aminokisljine C terminalnega konca peptida oz. njihove stranske verige umestijo v prostore S_1' , S_2' in S_1 . Vsi trije prostori so hidrofobne narave. Aminokislinske stranske verige S_2' prostora tvorijo hidrofobne interakcije z umeščenimi skupinami angiotenzina I (oz. ACE inhibitorja). Slika 2 med drugim prikazuje aktivno mesto ACE encima. Levcin se umesti v S_2' prostor; negativno nabita COO^- skupina levcina pa tvori ionsko vez s pozitivno nabito skupino v aktivnem mestu encima v bližini S_2' prostora. Histidin se umesti v prostor S_1' , fenilalanin pa v prostor S_1 . Kisik peptidne vezi med Leu in His tvori vodikovo vez z encimom. Zn^{2+} med prostoroma S_1' in S_1 je vpleten v hidrolitično cepitev peptidne vezi angiotenzina I. (5)

Že leta 1982 so na primeru kaptoprila predvideli, katere funkcionalne skupine inhibitorja in encima so vpletene v vezavo. Naslednje funkcionalne skupine inhibitorja so tako bistveni strukturni elementi: *karboksilna skupina* interagira s pozitivno nabitim centrom encima

(najverjetneje gre za stransko verigo Arg ali Lys (6)) $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)(\text{NH}_2^+)$ ali $-\text{NH}_3^+$, karbonylna skupina tvori vodikovo vez z $=\text{NH}$ skupino encima in tiolna skupina, ki tvori koordinacijsko vez z Zn^{2+} . (7)



Slika 2: Model vezave ACE inhibitorja v aktivnem mestu ACE

1.1.3 STRUKTURA IN DELOVANJE ACE INHIBITORJEV

1.1.3.1 Struktura ACE inhibitorjev

Z namenom zagotoviti čim večjo aktivnost učinkovine s pomočjo izbire ustreznih funkcionalnih skupin so bile na ACE inhibitorjih izvedene tudi številne SAR (structure – activity relationship) študije. Slika 2 ponazarja vezavo ACE inhibitorja v aktivno mesto encima. Študije so pokazale, da so na P₂' mestu ACE inhibitorja, ki se veže v S₂'področje najbolj primerne aromatske in ciklične aminokisliline (Phe, Tyr, Trp in Pro); na mestu P₁', ki interagira s S₁' področjem, pa so zaželene linearne ali ciklične skupine (Val, Ile in Lys). (4) Na položaju P₁ so najbolj primerne nenaravne aminokisliline in derivati heterocikličnih karboksilnih kislin. (6) Poleg tiolne skupine so za nastanek koordinacijske vezi na mestu X primerne tudi karboksilna, hidroksilna ali fosfatna skupina. (8)

1.1.3.2 Delovanje ACE inhibitorjev

Zaviralci angiotenzinske konvertaze se kompetativno vežejo v aktivno mesto encima in tako preprečijo nastanek angiotenzina II. Znižan nivo angiotenzina II vodi v dilatacijo perifernih žil in zmanjšanje perifernega upora, krvni tlak se zato zniža.

ACE inhibitorji so predzdravila, ki se v aktivno obliko pretvorijo šele po absorpciji, in sicer v jetih s hidrolizo estrske vezi. (2)

Uporabni so pri hipertenziji v monoterapiji in kombinaciji z drugimi zdravili, predvsem z diuretiki in antagonisti kalcijevih kanalov. Uporabljajo se tudi v terapiji sladkorne bolezni (upočasni napredovanje glomerulopatije in zmanjšajo proteinurijo), pri preprečevanju napredovanja kroničnih ledvičnih okvar, pri določenih oblikah srčnega popuščanja ter pri ishemični bolezni srca. Ta stanja so tudi pogosto povezana s hipertenzijo. (2, 9)

Pri nas registrirani ACE inhibitorji so: kaptopril (Kaptopril[®]) – tablete, enalapril (Enap[®], Olivin[®], Anaton[®]) – tablete in raztopina za injiciranje, lizinopril (Irumed[®]) – tablete, trandolapril (Gopten[®]) – trde kapsule, kapsule in tablete s podaljšanim sproščanjem, perindopril (Prexanil[®], Pernessa[®], Perindan[®], Noliprel[®], Bioprexanil[®]) – tablete in filmsko obložene tablete, ramipril (Ampril[®], Piramil[®], Tritace[®], Meramyl[®], Tritazide[®]) – tablete, cilazapril (Cilazil[®]) – tablete in fozinopril (Monopril[®], Fozinopril Arrow[®]) – tablete. (10)

1.2 ANALITSKA PODPORA STABILNOSTNIM ŠTUDIJAM

Naloga farmacevtske industrije je poleg izdelave farmacevtskih izdelkov tudi zagotavljanje njihove kakovosti, varnosti in učinkovitosti, zato je testiranje stabilnosti integralni del v razvoju in proizvodnji zdravilnih učinkovin in izdelkov.

Stabilnost zdravila definiramo kot sposobnost farmacevtskega izdelka, da ohranja svoje lastnosti znotraj specificiranih mej skozi svoj rok uporabnosti. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) priporoča obravnavo naslednjih stabilnostnih vidikov: kemični, fizikalni, mikrobiološki in biofarmacevtski vidik. Nestabilen je tisti pripravek, ki pod normalnimi pogoji shranjevanja pokaže značilne spremembe svojih lastnosti v času roka uporabnosti.

Splošno velja, da je zdravilo stabilno, če ustreza farmakopejskim predpisom oz. če v predpisanem času ne razpade več kot 10 %, po strožjih zahtevah pa 5 % učinkovine. Razpadni produkti ne smejo biti toksični in ne smejo povzročati neželenih učinkov. Kadar je v zdravilu več zdravilnih učinkovin, določamo stabilnost glede na hitrost razpada najmanj stabilne spojine. (11)

Kemični vidik stabilnosti obravnava različne načine kemijske degradacije: najpogosteje reakcije hidrolize in oksidacije, pri čemer je potrebno razpadne produkte kvantitativno in kvalitativno določiti. Pri vrednotenju kemične stabilnosti učinkovin se tako najpogosteje poslužujemo naslednjih analitskih metod: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, plinska kromatografija in masna spektrometrija. Za namene testiranja stabilnosti mora biti izbrana metoda stabilnostno indikativna.

FDA definira stabilnostno indikativne metode kot kvantitativne analitske metode, ki temeljijo na strukturnih karakteristikah, kemijskih in bioloških lastnostih posameznih sestavin farmacevtskega izdelka in omogočajo ločevanje posameznih sestavin od razpadnih produktov, tako da je mogoče natančno izmeriti vsebnost aktivnih sestavin. Metode za spremljanje stabilnosti farmacevtskih izdelkov morajo biti specifične za glavne analite in sposobne ločevati razpadne produkte ter nečistote. (12).

Zelo pomemben aspekt v razvoju stabilnostno indikativne metode predstavlja validacija, preko katere ovrednotimo ustreznost analitske metode.

1.2.1 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

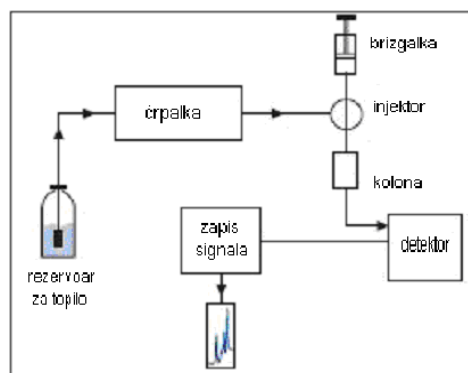
Kromatografija je analizna tehnika, ki temelji na ločevanju posameznih komponent vzorca na osnovi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti in ustrezni detekciji s ciljem kvantitativne ali kvalitativne določitve. V praksi skušamo doseči čim boljše separacijo v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema.

Raztopljeni vzorec in mobilno fazo pod visokim pritiskom potiskamo skozi kolono s posebnimi črpalkami. Molekule na svoji poti skozi kolono ves čas prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi, v stacionarni pa se zadržujejo. Izbira stacionarne in mobilne faze je zaradi tega zelo pomembna.

Z razvojem črpalk za visoke tlake, ki omogočajo konstantne pretoke brez pulziranja, in z razvojem tehnologije izdelave kolon ter različnih detektorjev je postala HPLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih in anorganskih spojin ter tako zavzema pomembno vlogo v stabilnostnih študijah učinkovin. Z ustreznim razvojem in validacijo HPLC metode lahko dosežemo natančnost, točnost, občutljivost in ločljivost; velika prednost metode pa je tudi v majhni porabi vzorca. (13, 14)

Vsak HPLC sistem mora imeti naslednje komponente (Slika 3):

- rezervoar za mobilno fazo
- črpalko
- injektor
- kromatografsko kolono
- detektor
- instrument za zapis in obdelavo signala



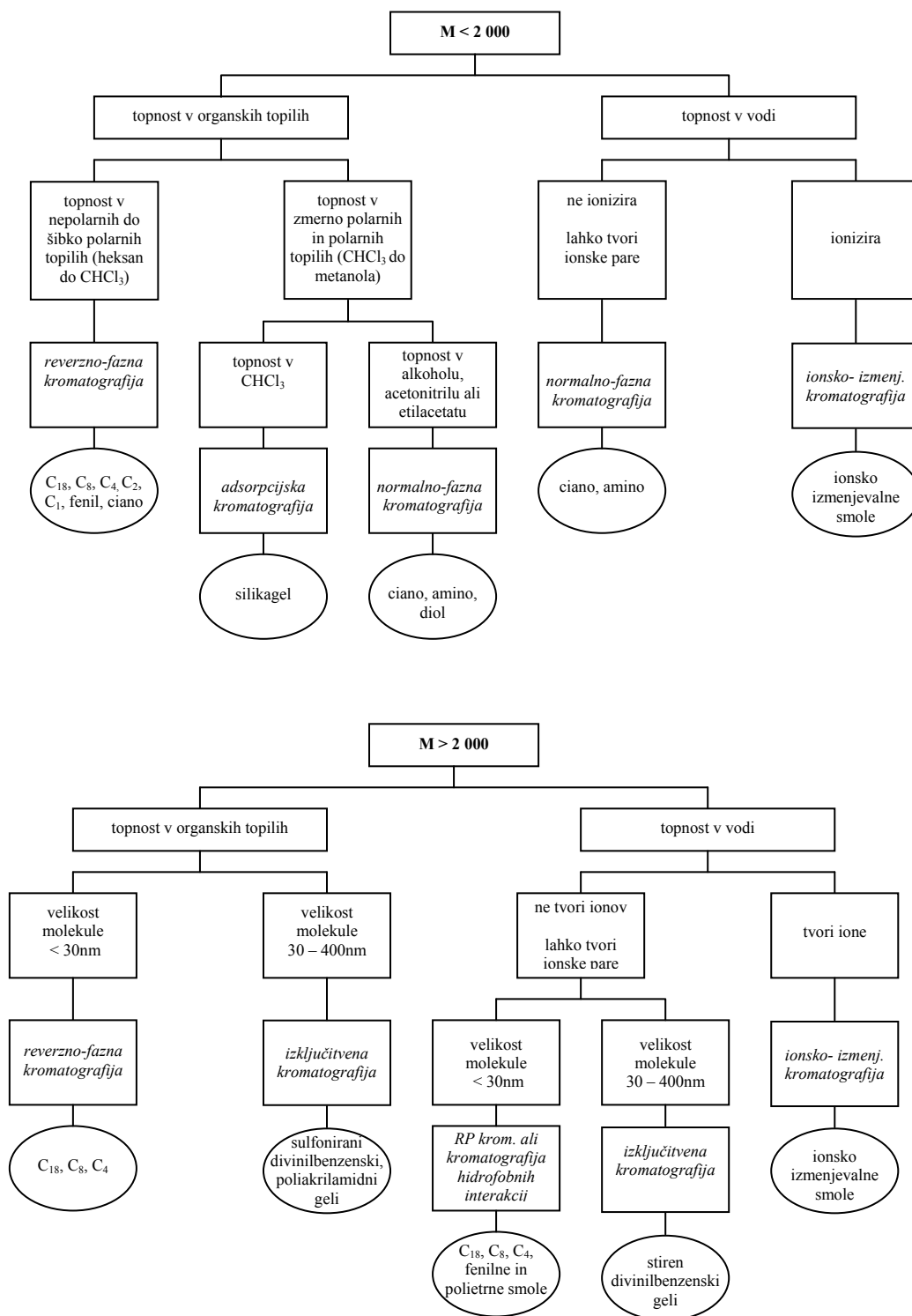
Slika 3: Shematski prikaz HPLC aparature (15)

1.2.1.1 Izbor separacijske tehnike in stacionarne faze

Danes je za delo v tekočinski kromatografiji na razpolago mnogo stacionarnih faz, ki nam omogočajo separacijo na osnovi različnih tipov selektivnosti. Pomembna dejavnika izbire separacijske tehnike sta molekulska masa in polarnost analita. Polarnost opredelimo s pomočjo topnosti analita v različno polarnih topilih. Pri separaciji je zelo pomembno ravnovesje intermolekularnih sil med tremi bistvenimi deli kromatografskega sistema: analita, mobilne faze in stacionarne faze. Najpogosteje je v uporabi princip ujemanja polarnosti SF in analita, medtem ko se MF po polarnosti razlikuje. Na ta način preprečimo prehitro elucijo analita ter s tem prekratke retencijske čase. Vendar pa ni zaželeno, da sta SF in analit po polarnosti preveč podobna, saj se v tem primeru analit na SF predolgo zadržuje in so retencijski časi predolgi. (13)

Slika 4 prikazuje odločitveno drevo, s pomočjo katerega lahko preko lastnosti analita izberemo najbolj primeren tip tekočinske kromatografije in stacionarne faze.

V študijah stabilnosti se srečujemo z učinkovinami z različnimi lastnostmi: visoko in nizko molekularne spojine, polarne in nepolarne, ionizirajoče in neionizirajoče spojine itd. Zaradi raznolikosti lastnosti učinkovin in razpadnih produktov imajo pomembno vlogo stabilnostnih študijah naslednji 4 tipi tekočinske kromatografije: *adsorpcijska*, *ionsko-izmenjevalna*, *gelska ali izključitvena* in *porazdelitvena kromatografija*.



Slika 4: Koraki izbire tipa tekočinske kromatografije in SF za spojine z $M > 2000$ in $M < 2000$ (16)

Adsorpcijska kromatografija

Pri adsorpcijski kromatografiji prihaja do porazdelitve molekul vzorca med trdno polarno stacionarno fazo in tekočo nepolarno mobilno fazo. Kot mobilna faza se največkrat uporabljajo alifatski ogljikovodiki, diklorometan, kloroform in acetonitril ter v manjši meri še dodatki kot so alkoholi, dioksan, tetrahidrofuran, očetna kislina in dietilamin.

Najpogosteje uporabljena stacionarna faza v adsorpcijski kromatografiji je silikagel ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$), kjer so silanolne skupine ($-\text{Si}-\text{OH}$) odgovorne za retencijo topljencev. Ker so šibko kisle narave, se bazični topljenci bolj zadržujejo kot kisli in nevtralni. Poleg silicijevih oksidov se kot stacionarne faze uporabljajo tudi oksidi aluminija in magnezija.

Adsorpcijska kromatografija se predvsem uporablja za ločitev nepolarnih spojin z omejeno topnostjo v vodnem mediju, katerih molska masa ne presega 2 000 Da. (13, 16, 17, 18)

Kljub omembi adsorpcijske kromatografije kot metode uporabne tudi v stabilnostnih študijah, pa primerov uporabe le-te v literaturi nismo zasledili.

Ionsko-izmenjevalna kromatografija

Princip ionsko-izmenjevalne kromatografije temelji na reverzibilni izmenjavi ionov med mobilno in stacionarno fazo. Stacionarno fazo predstavljajo običajno delci silicijevega oksida ali organskega polimera (npr. polistiren-divinilbenzen), na katerega so kovalentno vezane kationske ali anionske izmenjevalne skupine. Primer kationske izmenjevalne skupine je sulfonska skupina $-\text{SO}_3\text{H}^+$, primer anionske izmenjevalne skupine pa so kvarterne amino skupine $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$. Kot mobilna faza se večinoma uporabljajo raztopine pufrov; pomemben parameter pri separaciji pa predstavlja pH in ionska moč mobilne faze.

Ionsko-izmenjevalna kromatografija se uporablja za ločitev polarnih spojin z ionskimi funkcionalnimi skupinami; molekulska masa ne predstavlja omejitve. Na kationski izmenjevalni smoli tako ločujemo npr. aminoglikozide in kateholamine; na anionski pa nukleotide in metabolite zdravil (sulfate in glukoronide). (13, 16, 17, 18)

V literaturi najdemo redke primere uporabe ionsko-izmenjevalne kromatografije v testiranju stabilnosti. Princip anionske izmenjave je opisan v članku Micheela in sodelavcev. Razvili so stabilnostno indikativno metodo določevanja sulfatnih (SO_4^{2-}) in sulfamatnih (SO_3NH_2^-) ionov, ki so produkt razpada topiramata (antikonvulziv), z namenom ločiti oba iona – monovalentni sulfamat in dvovalentni sulfat in hkrati doseči

sprejemljiv retencijski čas sulfatnega iona, ki se zaradi multivalentnosti močneje veže na SF in zaradi tega dlje zadržuje na koloni. (19)

Primer določevanja organskega iona z ionsko-izmenjevalno kromatografijo je ugotavljanje metansulfonske kisline kot produkta hidroliznega razpada busulfama (citostatik). Metodo so razvili Kotinkadue in sodelavci. (20)

Gelska ali izključitvena kromatografija

Princip izključitvene kromatografije je selektivna difuzija molekul vzorca. Molekule se namreč ujamejo v pore v SF in se tako izločijo iz toka mobilne faze, čas retencije pa je odvisen od velikosti in delno tudi od oblike molekule. Molekule večje od povprečne velikosti por se ne zadržujejo in se eluirajo prve, molekule z zelo majhnim premerom pa se eluirajo zadnje. Stacionarno fazo predstavlja močno porozna snov s porami različnih velikosti. Najpogosteje so v uporabi hidrofobni stiren-divinilbenzenski geli, hidrofilni sulfonirani divinil-benzenski in poliakrilamidni geli.

Ta tip kromatografije je primeren za separacijo polarnih in nepolarnih neionskih spojin oz. ionskih parov z molsko maso nad 2 000 Da ter velikostjo molekule 30–400 nm. (13, 16, 17, 18)

Primer izključitvene kromatografije v stabilnostnih študijah je študija vpliva strižnih sil na stabilnost proteinov. Stabilnost in čistoto proteinov lahko določamo bodisi z izključitveno kromatografijo bodisi z reverzno-fazno porazdelitveno kromatografijo (RP-HPLC). Slednja je primernejša, kadar spremljamo kemijsko nestabilnost proteinov, saj prisotnost organskih modifikatorjev v mobilni fazi navadno povzroči denaturacijo in fizikalno nestabilnost proteinov. Zaradi predvidene nestabilnosti je bila tako izključitvena kromatografija metoda prvega izbora. (21)

Porazdelitvena kromatografija

Porazdelitvena kromatografija spada med najpogosteje uporabljene kromatografske metode v stabilnostnih študijah. Do ločitve komponent vzorca prihaja zaradi različne hitrosti potovanja komponent v okolju stacionarne in okolju mobilne faze, ki sta si po polarnosti različni. Komponenta se dalj časa zadržuje v fazi, kateri je po polarnosti bolj podobna. V primeru, da je to mobilna faza, bo prišlo do hitre elucije komponente; če pa je podobnost s stacionarno fazo večja, se bo komponenta dalj časa zadržala v kromatografskem sistemu. Stacionarno fazo predstavljajo delci silikagela z zaetrenimi

silanolnimi skupinami; najpogosteje so to t.i. siloksani pridobljeni z reakcijo z organoklorsilani, pri čemer dobimo zaetrene alkilne verige različnih dolžin, najpogosteje 8 ali 18 C atomov, ki pa lahko vsebujejo tudi polarne funkcionalne skupine. Mobilna faza je tekoča in je lahko polarna ali nepolarna. (13, 16, 17, 18)

Glede na polarnost stacionarne in mobilne faze ločimo dva tipa porazdelitvene kromatografije: normalno-fazna in reverzno-fazna kromatografija.

Normalno-fazna kromatografija se uporablja za ločevanje srednje do močno polarnih spojin z molsko maso manjšo od 2 000 Da. Stacionarna faza je polarna in sicer so na delce silikagela preko siloksanske vezi (Si–O–Si) vezane kratke nasičene ogljikovodikove verige s terminalnimi polarnimi skupinami (npr. –NH₂, –CN, –OH). Mobilno fazo predstavljajo nepolarna topila (etileter, kloroform, n-heksan). (13, 16, 17, 18)

V študijah stabilnosti so primeri uporabe normalno-fazne kromatografije redki. Srinivasu in sodelavci so razvili stabilnostno indikativno metodo za določevanje cis/trans izomer zolmitriptana (antimigrenik, serotoninški agonist) in prisotne nečistote. Ločitev bolj polarne nečistote in enantiomerov zolmitriptana so dosegli z izbiro kiralne stacionarne faze: na silikagel vezan derivat amiloze. Izključno nepolarna mobilna faza (heksan, izopropanol) ni zagotovila ločitve enantiomer, to so dosegli šele z dodatkom metanola in optimizirali z dodatkom dietilamina. (22)

Reverzno-fazna kromatografija se uporablja za ločevanje manj polarnih in nepolarnih spojin; molekulska masa ne predstavlja omejitve, omejitev pa predstavlja velikost molekule, ki naj ne bi presegala 30 nm. Stacionarna faza je lahko nepolarna in sicer so na delce silikagela preko siloksanske vezi vezane nasičene ogljikovodikove verige, največkrat oktil (-C₈) ali oktadecil (-C₁₈) alkilne verige ali pa delno polarna (z –NH₂, –CN skupinami). Mobilno fazo predstavljajo polarna topila (metanol, acetonitril, voda). (13, 16, 17, 18)

Razvoj RP-HPLC vključuje optimizacijo retencije in selektivnosti. Na retencijo analita vpliva polarnost oz. sestava mobilne faze (manj polarna MF – večji delež organskega modifikatorja pomeni zmanjšanje retencije), pH mobilne faze, kadar imamo opravka z analiti z nabojem (z znižanjem pH retencija kislin naraste zaradi zvečanja hidrofobnosti na račun večjega deleža neprotonirane oblike), lastnosti kolone (velikost delcev, dolžina kolone ter vrsta vezane faze – bolj polarna kolona CN v primerjavi z C₁₈ pomeni

zmanjšanje retencije) in temperatura (zvišanje temperature povzroči zmanjšanje retencije). Na selektivnost vpliva predvsem polarnost MF (bolj polarna MF pomeni boljše selektivnost in tudi resolucijo do določene meje) ter pH mobilne faze, vplivata pa tudi vrsta kolone in temperatura. (23, 24)

Ta tip kromatografije je najpogosteje uporabljena metoda v stabilnostnih študijah. Poleg nabora ostalih zdravilnih učinkovin najdemo v sklopu tega tipa kromatografije tudi študije stabilnosti na ACE inhibitorjih: enalapril, cilazapril, perindopril, ramipril, benazepril, kaptopril, lizinopril (25).

Pogostost uporabe nepolarnih kolon je večja kot uporaba delno polarnih kolon. Nepolarne SF so bile me drugim uporabljene v študijah stabilnosti na naslednjih spojinah: vitamin C (C_{18} kolona) (26), rekombinantna protitelesa (C_8 kolona) (27), ACE inhibitorji (C_{18} in C_8 kolone) (25); primer uporabe delno polarne SF pa je študija stabilnosti nelfinavir mezilata (CN kolona) (28).

Reverzno-fazna kromatografija, ki se uporablja tudi za ločevanje močnejših kislin in baz, se imenuje *kromatografija ionskih parov*. Ravnotežja med ionizirano in neionizirano obliko teh spojin z uravnavanjem pH namreč ne moremo potisniti v smer neionizirane oblike, zato se slabo zadržujejo na SF, njihovi vrhovi v kromatogramih pa so razvlečeni v obliki dolgih repov. Pri kromatografiji ionskih parov v mobilno fazo dodamo ionsko parni reagent t.i. »ion pairing« reagent, ki tvori z ionizirano spojino reverzibilni navzven nevtralni kompleks, le-ta pa se nato porazdeljuje med polarno mobilno fazo in nepolarno stacionarno fazo. (13, 16, 17, 18)

Primer kromatografije ionskih parov je spremljanje stabilnosti zoledronske kisline (inhibitor kostne resorpcije). Z dodatkom tetra-butil amonijevega hidrogensulfata kot »ion-pairing« reagenta so zagotovili optimalno ločitev in retencijo učinkovine in njenih razpadnih produktov. (29)

1.2.2 MASNA SPEKTROMETRIJA

Lastnosti idealnega detektorja so: visoka občutljivost, linearni odziv in neobčutljivost na spremembe temperature in sestave topila. V HPLC uporabljamo pretočne detektorje s celicami, ki imajo majhne volumne. Tako se izognemo razširitvi ozkih vrhov. (18)

Najpogosteje pri HPLC uporabljamo UV-VIS detektorje (spektrofotometre), ki delujejo na principu absorpcije svetlobe v ultravijoličnem in vidnem delu spektra. Drugi detektorji so še: fluorescenčni in elektrokemični detektor, detektor za merjenje lomnega količnika, prevodnosti in dielektrične konstante ter masni spektrometer, ki vedno bolj pridobiva na veljavi. (13, 18)

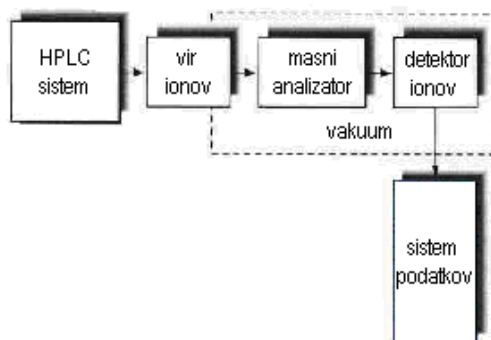
Prednosti masnega spektrometra kot detektorja za HPLC so v visoki selektivnosti in občutljivosti. Je idealni detektor za analizo kompleksnih vzorcev, saj omogoča identifikacijo posameznih komponent, ki se eluirajo iz kolone. Z masnega spektra lahko dobimo kvalitativne informacije o molekularni masi in strukturi ter tudi kvantitativne podatke analize. (13)

Z masnim spektrometrom lahko analiziramo spojine brez ustreznega kromofora, hkrati pa omogoča tudi identifikacijo spojin, katerih kromatografski vrhovi se niso ločili. (30)

Masna spektrometrija se uporablja kot samostojna tehnika, v velikem obsegu pa tudi kot sklopljena z drugimi analiznimi tehnikami. V stabilnostnih študijah je z namenom identifikacije razpadnih produktov najpogosteje uporabljena masna spektrometrija sklopljena s HPLC, t.i. LC-MS. (14)

1.2.2.1 Zgradba HPLC sistema sklopljenega z MS

Masni spektrometer deluje na principu ionizacije molekul in ločitve ter identifikacije nastalih ionov glede na razmerje njihove mase in naboja (m/z). Slika 5 prikazuje zgradbo HPLC sistema sklopljenega z MS. Ključni komponenti sistema sta *ionizacijski vir*, ki ustvarja ione (s pozitivnim ali negativnim nabojem) in *masni analizator*, ki ione razvršča. (30, 31)



Slika 5: Zgradba HPLC sistema sklopljenega z MS (13)

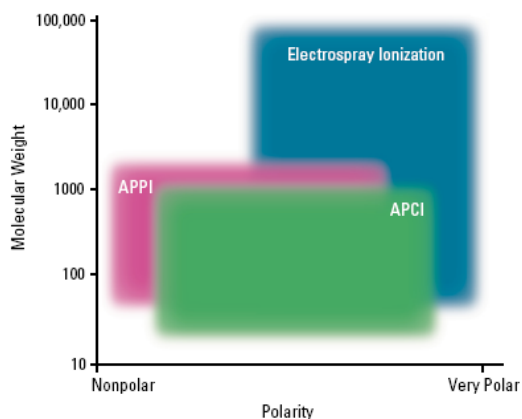
Danes je na razpolago več vrst ionizacijskih virov in prav tako več tipov analizatorjev. V nadaljevanju so z vidika stabilnostnih študij predstavljeni najpomembnejši in najpogosteje uporabljeni tipi ionizacije in analizatorjev.

1.2.2.2 Izbor tipa ionizacije in masnega analizatorja

Tipi ionizacije

Zgodnji LC-MS sistemi so omogočali ionizacijo molekul analita le v vakuumu. Uvedba metod ionizacije pri atmosferskem tlaku (atmospheric pressure ionization – API) je povečala število uspešno analiziranih spojin z LC-MS. Razlika je v tem, da pri API metodi molekule analita ionizirajo prve pri atmosferskem tlaku, ioni so nato mehansko in elektrostatskično ločeni od molekul mobilne faze. (30)

Najbolj uporabni metodi ionizacije v stabilnostnih študijah sta *elektrozprševalna ionizacija (ESI)* in *kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (APCI)*; obe spadata med API metode. Možnosti in omejitve uporabe teh dveh metod prikazuje Slika 6.



Slika 6: Uporabnost LC-MS ionizacijskih metod glede na polarnost in velikost molekule
(30)

- *Elektrozprševalna ionizacija (Electrospray ionization – ESI)*

Analit ionizira pri pretoku skozi cevko, ki je pod električno napetostjo, še preden doseže masni spektrometer. Analit z MF razpršujemo v prostor z atmosferskim tlakom v prisotnosti elektrostatičnega polja in segretega suhega plina (N_2). Elektrostatično polje povzroči ionizacijo molekul analita, plin pa odparitev topila. Z odparevanjem topila se manjša volumen kapljic, s tem pa povečuje gostota naboja v njih do meje, ko so odbojne sile med ioni tako velike, da se kapljica razcepi na manjše kapljice in na koncu pride do desorpcije iona v plinasto fazo. (13, 30)

Opisana metoda ionizacije je primerna za analiziranje velikih polarnih molekul z molekulsko maso do 100 000 Da (18, 31), npr. proteinov, peptidov in oligonukleotidov ter tudi majhnih molekul kot so na primer benzodiazepini. (30)

Uporaba elektrozprševalne ionizacije v testiranju stabilnosti je zelo pogosta. ESI način se uporablja v kombinaciji z vsemi tremi tipi analizatorjev, ki so opisani v nadaljevanju poglavja. Klasična MS analiza razpadnih produktov je bila izvedena tekom stabilnostne študije na polimiksinih z namenom kvalitativne analize razpadnih produktov in določitve prevladujočega razpadnega mehanizma v različnih pH-jih in temperaturah. (32) ESI način ionizacije se uporablja tudi v MS/MS analizah kot v primeru določitve razpadnih produktov v stabilnostni študiji izvedeni na sumatriptanu. (33)

- *Kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (Atmospheric pressure chemical ionization – APCI)*

MF z analitom vodimo skozi segreti vmesnik s temperaturo 250–400 °C pri atmosferskem tlaku, tako da visoka temperatura upari tekočino. Elektroda ionizira molekule topila, ioni topila pa nato svoj naboj prenesejo na molekule analita preko kemijske reakcije. (30, 31)

APCI je primerna tudi za analizo manj polarnih molekul z molekulsko maso manjšo od 1 000 Da. Metoda ni primerna za analizo termolabilnih učinkovin. (18, 30)

Primer MS analize z APCI ionizacijo je identifikacija razpadnih produktov tinidazola v razvoju stabilnostno indikativne metode (34); MS/MS analizo pa so uporabili v stresni študiji za namen identifikacije razpadnih produktov v tabletah z losartanom (35).

Masni analizatorji

Idealni masni analizator bi bil sposoben zaznati in ločiti zelo majhne razlike v razmerjih masa/naboj med različnimi ioni, poleg tega pa zagotoviti pretok zadostnega števila ionov, kar bi posledično omogočilo takojšnje merjenje ionskih tokov. Zmogljivost danes dostopnih masnih analizatorjev tako predstavlja kompromis med obema želenima lastnostima. (13)

Analizatorji, ki se najpogosteje uporabljajo v stabilnostnih študijah so: *kvadrupolni masni analizatorji*, *masni analizatorji na osnovi časa preleta* in *masni analizatorji z ionsko pastjo*.

- *Kvadrupolni masni analizatorji (Quadrupole)*

Masni analizator tipa kvadrupol je sestavljen iz 4 vzporednih kovinskih palic razporejenih v kvadrat, vzdolž katerih potujejo ioni analita. Palice so pod električno napetostjo, tako da ustvarjajo elektromagnetno polje, ki določa, katera m/z razmerja ionov bodo lahko prešla filter.

Kvadrupolni masni analizatorji lahko delujejo na dva načina: način »*Scan mode*«, kjer analizator spremlja razmerja m/z vseh ionov (v kvalitativni analizi ali v kvantitativni analizi, ko mase analitov niso znane) ter »*Selected ion monitoring (SIM) mode*«, kjer analizator spremlja razmerja m/z le nekaterih ionov (v kvantitativni analizi). (30)

Pogosta je uporaba treh zaporedno vezanih kvadrupolov – trojnega kvadrupolnega masnega analizatorja (*Triple Quadrupole*), ki je namenjen MS/MS analizam. (31)

Primeri uporabe trojnega kvadrupolnega masnega analizatorja so v študijah stabilnosti izvedenih na sumatriptanu (ESI način) (33) in losartanu (APCI način) (35).

- *Masni analizator na osnovi časa preleta (Time-of-flight analizator – TOF)*

Električna napetost povzroči tok ionov skozi cevko brez magnetnega polja (dolžine 25 cm – 1,5 m). Čas, ki ga ion porabi za pot, je sorazmeren kvadratnemu korenu razmerja m/z (lažji ioni seveda potujejo hitreje). (31) Slabost TOF analizatorjev je slabša ločljivost in občutljivost. (13) TOF analizatorji so uporabni za analizo spojin z visoko molsko maso (do nekaj 100 000 Da). (31)

V literaturi je opisan primer uporabe TOF analizatorja v LC-MS analizi vzorcev rekombinantnih protiteles (ESI način) z namenom optimizacije analizne metode za določitev heterogenosti in stabilnosti rekombinantnih protiteles. (27)

- *Masni analizator z ionsko pastjo (Ion trap analizator – IT)*

Analizator vsebuje obročasto elektrodo, ki v komori ustvari tridimenzionalno elektromagnetno polje in na ta način ujame ione. Z izborom električne napetosti določimo glede na m/z razmerje, kateri ioni bodo ujeti. Selektivni izpust ionov dosežemo z dodatnim elektromagnetnim poljem. Prednost IT analizatorja je v tem, da omogoča snemanje spektrov iona skozi več generacij (MS^n). (13, 30, 31)

IT analizator je bil uporabljen v študijah stabilnosti izvedenih na polimiksinih (ESI način) (32) in tinidazolu (APCI način) (34).

2 NAMEN DELA

Zagotavljanje stabilnosti je pomemben segment v razvoju in proizvodnji zdravilnih učinkovin in farmacevtskih pripravkov. Namen našega dela bo določitev stabilnosti razvojnega »prila« s HPLC metodo ter primerjava HPLC rezultatov stabilnostne študije z rezultati nekaterih drugih ACE inhibitorjev s ciljem ugotoviti vpliv strukture na stabilnost. Poleg stabilnostne študije pa bomo izvedli tudi identifikacijo razpadnih produktov razvojnega ACE inhibitorja z LC-MS metodo.

Za namen testiranja stabilnosti bomo razvili stabilnostno indikativno HPLC metodo, s katero bomo lahko kvantitativno določili vsebnost razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov. Pri tem bomo prilagodili sestavo mobilne faze in izbrali stacionarno fazo ter kromatografske pogoje.

Želimo, da bo razvita metoda uporabna tudi v LC-MS analizi, s pomočjo katere bomo identificirali razpadne produkte in predvideli mehanizem razpada razvojnega »prila«.

Zelo pomemben aspekt v razvoju stabilnostno indikativne metode predstavlja validacija, preko katere potrdimo primernost in zanesljivost metode za predvideno analitsko rabo. V ta namen bomo izvedli stresno študijo in ovrednotili naslednje parametre: selektivnost, točnost, natančnost injiciranja, mejo detekcije in mejo kvantifikacije.

Preko stabilnostne študije bomo spremljali stabilnost vodne raztopine razvojnega »prila« pri različnih pogojih: pri pH 2,0, 6,8 in 12,0 ter temperaturah 40, 60 in 80 °C. S pomočjo teh poskusov bomo skušali izzvati nestabilnost učinkovine in preveriti vpliv pH raztopine in temperature na obseg in hitrost razgradnje. Kvantitativno bomo ovrednotili delež razvojnega ACE inhibitorja in njegovih razpadnih produktov v analiziranih vzorcih.

Na podlagi primerjave rezultatov stabilnostne študije razvojnega »prila« in dostopnih podatkov stabilnostnih študij nekaterih ACE inhibitorjev (enalapril, cilazapril, perindopril in ramipril) bomo ocenili vpliv strukture na stabilnost ACE inhibitorjev.

3 MATERIALI IN METODE

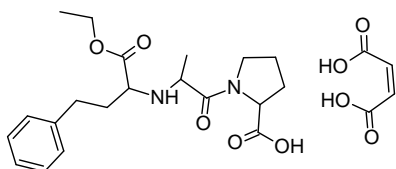
3.1 MATERIALI

3.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI IN TOPILA

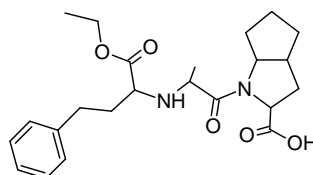
- KE – 694, eksperimentalni ACE inhibitor, neznani podatki o kakovosti, dobavitelj: Krka d.d., Novo mesto
- C₄H₄O₄ (maleinska kislina) – p.a., Mr = 116,1 g/mol, Sigma – Aldrich Chemie
- Pufer pH 2,0 – raztopina 136 mg KH₂PO₄ v 1000 mL vode Milli Q, (kalijev dihidrogenfosfat, Mr = 136,09 g/mol, pH korigiran z ortofosforjevo kislino), Krka d.d., Novo mesto
- Pufer pH 6,8 – raztopina 136 mg KH₂PO₄ v 1000 mL vode Milli Q, (kalijev dihidrogenfosfat, Mr = 136,09 g/mol, pH korigiran z 20 % KOH), Krka d.d., Novo mesto
- Pufer pH 12,0 – raztopina 136 mg KH₂PO₄ v 1000 mL vode Milli Q, (kalijev dihidrogenfosfat, Mr = 136,09 g/mol, pH korigiran z 20 % KOH), Krka d.d., Novo mesto
- Bidestilirana voda – H₂O, Fakulteta za farmacijo
- HCl (klorovodikova kislina) – p.a., za 1M raztopino, Kefolab
- NaOH (natrijev hidroksid) – p.a., za 1M raztopino, Merck
- MeOH 99,9 % (metanol) – kromatografske čistote, Mr = 32,04 g/mol, Sigma – Aldrich Chemie
- C₃H₁₅N (TEA, trietilamin) – p.a., Mr = 101,19 g/mol, Merck
- CH₃COONH₄ (AmAc, amonijev acetat) – p.a., Mr = 77,08 g/mol, Acros Organics
- CH₃CN (ACN, acetonitril) – kromatografske čistote, Mr = 41,05 g/mol, Sigma – Aldrich Chemie
- CH₃COOH 99–100 % (ocetna kislina) – p.a., Mr = 60,05 g/mol, J.T. Baker
- CF₃COOH 100 % (TFA, trifluoroocetna kislina) – p.a., Mr = 114,02 g/mol, Merck
- HCOOH 98–100 % (FA, mravljična kislina) – p.a., Mr = 46,03 g/mol, Merck
- H₃PO₄ 85 % (ortofosforjeva kislina) – p.a., Mr = 98,00 g/mol, gostota = 1,71 g/mL, Merck

3.1.2 ACE INHIBITORJI VKLJUČENI V STABILNOSTNO ŠTUDIJO

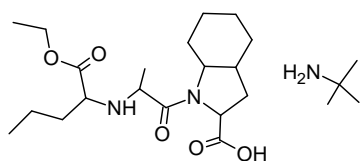
V primerjavo so bili vključeni naslednji ACE inhibitorji: enalapril (Spojina 1), ramipril (Spojina 2), perindopril (Spojina 3), cilazapril (Spojina 4) in razvojni »pril« (Spojina 5).



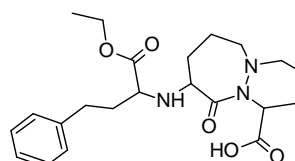
Spojina 1: Enalapril maleat



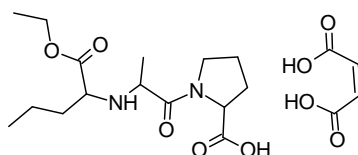
Spojina 2: Ramipril



Spojina 3: Perindopril terc-butilamin



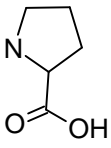
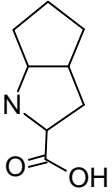
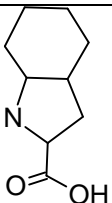
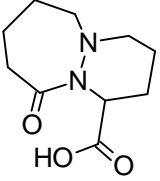
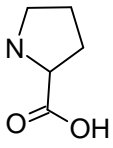
Spojina 4: Cilazapril



Spojina 5: Razvojni »pril« v obliki soli (maleat)

Tabela I prikazuje razlike med bistvenimi strukturnimi elementi ACE inhibitorjev, katerih rezultati stabilnostnih študij so bili vključeni v primerjavo. Oznake X, R₁, R in P₂ se nanašajo na strukturo ACE inhibitorja prikazano na Sliki 2.

Tabela I: Strukturni elementi ACE inhibitorjev vključenih v primerjavo

	<i>Enalapril</i>	<i>Ramipril</i>	<i>Perindopril</i>	<i>Cilazapril</i>	<i>Razvojni »pril«</i>
<i>X</i>	-CH ₂ CH ₂ Ph	-CH ₂ CH ₂ Ph	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₂ Ph	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
<i>R</i> ₁	-COOEt	-COOEt	-COOEt	-COOEt	-COOEt
<i>R</i>	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃		-CH ₃
<i>P</i> ₂					

Kemijsko ime razvojnega ACE inhibitorja je: (2S)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-(etoksikarbonil)-butil] amino] propanoil] pirolidin-2-karbonska kislina, nosi pa oznako: KE – 694. V diplomskem delu zanj uporabljam izraz razvojni »pril«. Razvojni »pril« zdužuje v svoji strukturi strukturne elemente enalapрила in perindopрила. Celoten skelet je enak kot pri enalaprilu, le X del molekule je enak kot pri perindoprilu.

Izbor analizne metode ter stabilnost substance temeljita na lastnostih spojine, ki pa so v največji meri odvisne prav od njene strukture. V Tabeli II so opisane lastnosti izbranih ACE inhibitorjev. Podatki o lastnostih razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktih niso na voljo.

Tabela II: Pregled lastnosti ACE inhibitorjev vključenih v primerjavo

	<i>Enalapril</i>	<i>Ramipril</i>	<i>Perindopril</i>	<i>Cilazapril</i>
<i>Lastnosti (31)</i>	bel ali skoraj bel kristaliničen prašek			
<i>Topnost (31)</i>				
- v vodi	zmerno topen	zmerno topen	lahko topen	težko topen
- v metanolu	lahko topen	lahko topen	lahko topen ¹	lahko topen
- v diklorometanu	netopen	--	zmerno topen	lahko topen
<i>Temperatura tališča (31, 36, 37)</i>	143–145 °C	109 °C	157–159 °C	95–97 °C
<i>Disociacijske konstante (36, 38)</i>	pKa ₁ 3,0 pKa ₂ 5,4	pKa ₁ 3,7 pKa ₂ 5,5	pKa ₁ 3,7 pKa ₂ 5,7	pKa ₁ 3,3 pKa ₂ 5,9
<i>Biološka uporabnost</i>	60 %	50–60 %	65–75 %	60 %
<i>Čas dosega najvišje plazemske koncentracije</i>	3–4 ure	2–4 uri	3–4 ure	2 uri
<i>Delež vezave prilata na plazemske proteine</i>	50–60 %	56 %	10–20 %	--
<i>Pot izločanja</i>	urin/feces	urin/feces	urin	urin
<i>Razpolovni čas² (39)</i>	11 ur	13–17 ur ³	25–30 ur	9 ur

¹ v alkoholu

² po zaužitju enega odmerka

³ po zaužitju več odmerkov

3.1.3 NAPRAVE IN PRIBOR

HPLC sistem 1100 Series (Agilent):

- *Sistem 1* s kvarterno črpalko, razplinjevalcem, avtomatskim vzorčevalnikom, UV detektorjem, zbiralcem frakcij, programsko opremo ChemStation ter samostojnim termostatom za kolono (Knauer)

HPLC sistem ima zunanji termostat, kjer je mogoča le ročna nastavitev temperature, termostatirana pa ni celotna kolona. Vzorci so pred in med analizo shranjeni pri sobni temperaturi.

- *Sistem 2* z binarno črpalko, razplinjevalcem, termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom, termostatom za kolono, Diode Array detektorjem in programsko opremo ChemStation.

HPLC sistem ima vgrajen termostat, ki omogoča termostatiranje cele kolone, hkrati pa je zagotovljeno nastavljanje temperature kolone preko programske opreme sistema.

Vzorci so pred in med analizo shranjeni v avtomatskem vzorčevalniku s konstantno temperaturo, v našem primeru je bilo to pri 4 °C.

- *Kromatografska kolona 1*: Synergi Hydro, 4 µm, 250 x 4,6 mm (Phenomenex)

C₁₈ kolona dosega hidrofilnost zaradi s sekundarnimi polarni ligandi obdelane stacionarne faze. Prednost te kolone je sposobnost resolucije ekstremno polarnih in nepolarnih spojin z vodno mobilno fazo. Stabilna je v pH območju med 1,5 in 7. (40)

- *Kromatografska kolona 2*: Kromasil C₁₈, 5 µm, 250 x 4,0 mm (Bia)

Kolona s tradicionalno RP stacionarno fazo; velikost delcev je 5µm. Visoko učinkovitost dosega zaradi ozke porazdelitve velikosti delcev; visoko kemično stabilnost in večjo hidrofobnost pa zaradi visoke pokritosti površine stacionarne faze. (40)

LC-MS sistem Varian (Walnut Creek, ZDA):

- Črpalka: dve izokraski črpalki Varian Prostar 210
- Razplinjevalec: MetaChem
- Avtomatski vzorčevalnik: Prostar 420
- PDA detektor: Prostar 330

- Razdelilec pretoka (»splitter«)
- Infuzijska črpalka: Harvard Aparatus 11 Plus
- Masni detektor: 1200L Quadrupole MS/MS
- Program za obdelavo podatkov: Varian MS Workstation Version 6.5

Ostalo:

- UV spektrofotometer Agilent 8453
- Vodni kopeli: WB 13 in WB 30E
- Klimatska komora: VC 4034 – Vötsch Industrietechnik
- Digitalna tehtnica AB54-S (Mettler Toledo)
- pH meter HNP 5750 (Iskra)
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra)
- Magnetno mešalo HI 190 M (Hanna Instruments)
- Sistem za filtriranje Sartorius in celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45 μ m
- Avtomatske pipete 20–200 μ L in 200–1000 μ L (Eppendorf)
- Steklovina: čaše, merilne bučke, kapalke, tehtiči, merilni valji, polnilne pipete, viale
- Digestorij, spatula, Parafilm M[®], plastična kapalka

3.2 METODE

3.2.1 UPORABA TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI

3.2.1.1 Optimizacija metod

Priprava vzorčnih raztopin za optimizacijo analiznih metod:

Na začetku smo pripravili standardno raztopino razvojnega »prila«: v 25 mL bučko smo natehtali 1562 mg razvojnega »prila« in dopolnili do oznake z destilirano vodo. Koncentracija standardne raztopine je bila 62,5 mg/mL. Z redčenjem standardne raztopine smo pripravili tri delovne raztopine razvojnega »prila« s koncentracijo 5 mg/mL.

> 1. delovna raztopina

V 25 mL bučko smo s pomočjo polnilne pipete odmerili 2 mL standardne raztopine razvojnega »prila« in dopolnili do oznake z 0,1 M raztopino HCl.

> 2. delovna raztopina

V 25 mL bučko smo s pomočjo polnilne pipete odmerili 2 mL standardne raztopine razvojnega »prila« in dopolnili do oznake z destilirano vodo.

> 3. delovna raztopina

V 25 mL bučko smo s pomočjo polnilne pipete odmerili 2 mL standardne raztopine razvojnega »prila« in dopolnili do oznake z 0,1 M raztopino NaOH.

Iz vsake delovne raztopine smo odmerili 2 alikvota po 10 mL, ki smo ju nato shranjevali pri sobni temperaturi in pri 80 °C. Del 2. delovne raztopine smo shranili tudi v hladilnik.

Odvzeti vzorec smo pred analizo redčili do koncentracije 0,1 mg/mL v vialo po 1 mL, čemur je sledila HPLC analiza.

Raztopina maleinske kisline

V 50 mL bučko smo natehtali 2,5 mg maleinske kisline in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Koncentracija raztopine maleinske kisline je bila 0,05 mg/mL.

Priprava in uporaba mobilnih faz:

- *Mobilna faza amonijev acetat / acetonitril*

Natehtali smo 0,3854 g amonijevega acetata (AmAc) in raztopili v bučki z 0,5 L bidestilirane vode. Raztopino s koncentracijo 0,01 M smo prelili v čašo in postavili na magnetno mešalo ter med mešanjem s kapalko dodajali očetno kislino do uravnave pH na 3,8. pH smo spremljali s pH metrom, ki smo ga pred tem umerili s pufrom s pH 4,0. Raztopino smo filtrirali na sistemu za filtriranje in nato razplinili.

Pripravljeni raztopini smo s pomočjo programske opreme HPLC sistema dovajali acetonitril (ACN) tako, da smo analizo izvajali z naslednjimi sestavami mobilne faze:

- gradientna analiza: 40–90 % ACN (čas: 20 min)
- gradientna analiza: 10–30 % ACN (čas: 20 min)
- izokratska analiza: 100 % AmAc in 0 % ACN
- izokratska analiza: 30 % AmAc in 70 % ACN

- *Mobilna faza trifluoroocetna kislina / acetonitril*

1 L bidestilirane vode smo z avtomatsko pipeto dodali 0,5 mL trifluoroocetne kisline (TFA). Raztopino smo razplinili. Koncentracija tako pripravljene MF je bila 0,05 %.

Pripravljeni raztopini smo s pomočjo programske opreme HPLC sistema dovajali acetonitril tako, da smo analizo izvajali z naslednjimi sestavami te mobilne faze:

- gradientna analiza: 30–60 % ACN (čas: 20 min)
- izokratska analiza: 5 % TFA in 95 % ACN
- izokratska analiza: 15 % TFA in 85 % ACN
- izokratska analiza: 55 % TFA in 45 % ACN
- izokratska analiza: 70 % TFA in 30 % ACN
- izokratska analiza: 85 % TFA in 15 % ACN
- izokratska analiza: 90 % TFA in 10 % ACN
- izokratska analiza: 95 % TFA in 5 % ACN
- izokratska analiza: 100 % TFA in 0 % ACN

- *Mobilna faza trietilamin / metanol*

V digestoriju smo s pomočjo pipete odmerili 10 mL trietilamina (TEA) in ga prenesli v 1000 mL bučko, v katero smo dodali 750 mL bidestilirane vode ter jo postavili na magnetno mešalo. Dodali smo še toliko ortofosforjeve kisline (H_3PO_4), da je bil končni pH

raztopine 2,3. Med dodajanjem kisline s kapalko smo raztopino ves čas mešali s pomočjo magnetnega mešala in spremljali pH vrednost raztopine. pH meter smo pred tem umerili s pomočjo pufru z znanim pH.

Pripravljeni raztopini smo s pomočjo programske opreme HPLC sistema dovajali metanol (MeOH) tako, da smo analizo izvajali z naslednjimi sestavami te mobilne faze:

- izokratska analiza: 20 % TEA in 80 % MeOH
- izokratska analiza: 45 % TEA in 55 % MeOH
- izokratska analiza: 55 % TEA in 45 % MeOH
- izokratska analiza: 60 % TEA in 40 % MeOH
- izokratska analiza: 65 % TEA in 35 % MeOH
- izokratska analiza: 70 % TEA in 30 % MeOH
- izokratska analiza: 72 % TEA in 28 % MeOH
- izokratska analiza: 74 % TEA in 26 % MeOH
- izokratska analiza: 75 % TEA in 25 % MeOH

Razvojne metode:

Namen razvoja metod I do III je bil optimizacija analizne metode za kvalitativno določitev razvojnega »prila« in razpadnih produktov z MS analizo; namen razvoja metod Ia in IIa pa kvantifikacija teh spojin tekom stabilnostne študije.

Parametra, ki sta bila pri vseh metodah konstantna, sta pretok MF 1 mL/min in volumen injiciranja 25 μ L. Tabela III prikazuje kromatografske pogoje razvojnih metod.

Tabela III: Kromatografski pogoji razvojnih metod

<i>Metoda</i>	<i>HPLC sistem</i>	<i>MF</i>	<i>kolona</i>	<i>T</i>	<i>valovna dolžina</i>
<i>I</i>	1	AmAc / ACN	kolona 1	25 °C	215 nm
<i>II</i>	1	TFA / ACN	kolona 1	25 °C	215 nm
<i>III</i>	1	TFA / ACN	kolona 2	25 °C	215 nm
<i>Ia</i>	1	TEA / MeOH	kolona 2	40 °C	215 nm 225 nm
<i>IIa</i>	2	TEA / MeOH	kolona 2	40 °C 45 °C 50 °C 55 °C 60 °C	215 nm 205 nm

3.2.1.2 Vrednotenje HPLC analizne metode

Priprava raztopin za vrednotenje analizne metode

Osnovna 200 % raztopina za umeritveno premico

V 25 mL bučko smo natehtali 5,0 mg razvojnega »prila« ter dopolnili do oznake s pufrom pH 6,8. Koncentracija tako pripravljene osnovne raztopine je bila 0,2 mg/mL (oz. 200 % glede na koncentracijo 0,1 mg/mL pri stabilnostni študiji). Na podlagi te osnovne raztopine smo pripravili ostalih sedem raztopin standarda, ki smo jih uporabili za določitev umeritvene premice.

Raztopine sedmih različnih koncentracij

Raztopine smo pripravili tako, da smo s pomočjo avtomatske pipete odmerili preračunan volumen osnovne raztopine, ki smo ga prenesli v 1 mL vialo in z avtomatsko pipeto dodali še volumen destilirane vode. Volumni so podani v Tabeli IV.

Tabela IV: Priprava raztopin za vrednotenje analizne metode

<i>Raztopine za vrednotenje metode</i>	<i>Volumen osnovne raztopine</i>	<i>Volumen destilirane vode</i>
<i>Raztopina 125,0 %</i>	625 μ L	375 μ L
<i>Raztopina 100,0 %</i>	500 μ L	500 μ L
<i>Raztopina 75,0 %</i>	375 μ L	625 μ L
<i>Raztopina 50,0 %</i>	250 μ L	750 μ L
<i>Raztopina 25,0 %</i>	125 μ L	875 μ L
<i>Raztopina 10,0 %</i>	50 μ L	950 μ L
<i>Raztopina 5,0 %</i>	25 μ L	975 μ L

Kromatografski pogoji izbrane (optimizirane) metode:

- Kromatografski sistem 2
- Kromatografska kolona: Kromasil C₁₈, 5 μ m delci, 250 mm x 4,0 mm
- Mobilna faza: 70 % TEA in 30 % MeOH
- Pretok mobilne faze: 1 mL/min
- Volumen injiciranja: 25 μ L
- Temperatura kolone: 60 °C
- Čas analize: 11 minut
- Valovna dolžina UV detektorja: 205 in 215 nm

Statistični parametri vrednotenja

S pomočjo validacije potrdimo primernost in zanesljivost metode za predvideno analitsko rabo. Ustreznost analizne metode za določevanje spojin v danih vzorcih in zanesljivost rezultatov ovrednotimo s pomočjo določenih statističnih parametrov.

Obseg validacije je odvisen od izbire analizne metode in je podan v farmakopejah in ICH smernicah za validacijo analiznih metod. Validacijo moramo izvesti delno ali v celoti ob vsaki spremembi analizne metode. (11, 41) Ovrednotili smo specifičnost, linearnost, natančnost injiciranja, točnost, mejo detekcije in mejo kvantifikacije.

Selektivnost

Selektivnost je sposobnost metode, da pravilno in specifično identificira aktivne spojine in nečistote. Metoda je selektivna takrat, kadar so kromatografski vrhovi analiziranih komponent v vzorcu jasno ločeni oz. se med seboj ne prekrivajo.

Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala zagotavlja rezultate, ki so premosorazmerni s koncentracijo analizirane substance v vzorcu.

Iz sedmih točk v območju od 5,0 % do 125,0 % delovne koncentracije razvojnega »prila« (0,005 mg/mL – 0,125 mg/mL) pri pH 6,8 smo z metodo najmanjših kvadratov odklonov povprečnih odzivov izdelali umeritveno premico. Injiciranje posameznih koncentracij smo ponovili trikrat. Iz dobljenih odzivov smo določili pripadajočo enačbo umeritvene premice in determinacijski koeficient (r^2). Kot mejo sprejemljivosti smo si določili $r^2 \geq 0,9900$.

Umeritvenih premic razpadnih produktov nismo mogli izdelati, ker standardi spojin niso na voljo.

Natančnost injiciranja

Natančnost je merilo za razpršenost meritev pri istih analiznih pogojih. Za posamezno koncentracijo standardne raztopine smo primerjali stopnjo skladanja odzivov posameznega injiciranja. Vzorec smo injicirali trikrat. Določili smo poprečno natančnost v sedmih točkah pri treh injiciranjih. Rezultat smo podali kot standardno deviacijo (SD) in relativno standardno deviacijo (RSD). Natančnost injiciranja bo sprejemljiva, če bo RSD nižja od 5,0 %.

Točnost

Točnost je merilo ujemanja eksperimentalnih rezultatov s pravo vrednostjo. Iz enačbe umeritvene premice smo iz dobljenih odzivov izračunali ustrezne koncentracije standardnih raztopin in jih primerjali z dejanskimi koncentracijami. Rezultate smo podali kot procent ujemanja med izračunanimi in deklariranimi koncentracijami, ki naj bo v intervalu med 95,0 in 105,0 %.

Meja detekcije

Meja detekcije (*LOD, limit of detection*) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki ga lahko zaznamo z določeno metodo, toda ne nujno tudi kvantitativno določimo s točno vrednostjo. Meja detekcije je za naše potrebe sprejemljiva, če je koncentracija analita vsaj 0,001 mg/mL (1,0 % raztopina).

LOD smo določili na način, ki temelji na standardnem odklonu vrednosti odsekov na ordinati (σ) in na povprečni vrednosti naklonov umeritvenih premic analizirane spojine (S).

(12)

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S}$$

Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije (*LOQ, limit of quantitation*) je najnižja količina analita v vzorcu, ki ga lahko kvantitativno določimo z ustrezno natančnostjo in točnostjo. Meja kvantifikacije je sprejemljiva, če je koncentracija analita vsaj 0,005 mg/mL (5,0 % raztopina).

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

3.2.1.3 Stabilnostna študija

Kromatografski pogoji pri vrednotenju rezultatov stabilnostne študije so bili enaki kot pogoji pri validaciji metode opisani v poglavju 3.2.1.2.

Priprava vzorčnih raztopin za stabilnostno študijo

Pripravili smo tri osnovne raztopine s koncentracijo 0,1 mg/mL, iz katerih smo odmerili 3 alikvote po 50 mL, ki smo jih nato inkubirali pri točno določenih pogojih (40, 60 in 80 °C).

➤ *1. osnovna raztopina*

V 250 mL bučko smo natehtali 25 mg razvojnega »prila«in dopolnili do oznake z raztopino pufra s pH 2,0.

➤ *2. osnovna raztopina*

V 250 mL bučko smo natehtali 25 mg razvojnega »prila«in dopolnili do oznake z raztopino pufra s pH 6,8.

➤ *3. osnovna raztopina*

V 250 mL bučko smo natehtali 25 mg razvojnega »prila«in dopolnili do oznake z raztopino pufra s pH 12,0.

Vzorčili smo v določenih časovnih intervalih s pomočjo avtomatske pipete po 1 mL iz vsake bučke po dvakrat; iz bučk s 3. osnovno raztopino smo vzorčili le enkrat zaradi zelo hitrega razpada učinkovine pri pH 12,0. Vzorčili smo v vialo, ki smo jih shranjevali v zamrzovalniku do zaključka stabilnostne študije, nakar je sledila HPLC analiza; vzorce iz bučk s 3. osnovno raztopino pa smo analizirali takoj po vzorčenju.

Pred analizo ni bila potrebna dodatna priprava vzorca, saj smo dobljene vzorce neposredno injicirali v HPLC sistem.

Časovne točke vzorčenja po posameznih temperaturah pri pH 2,0:

40 °C: 0, 4, 16, 24, 48, 72, 144, 192, 312 in 480 ur

60 °C: 0, 4, 16, 24, 48, 72, 144, 192, 312 in 480 ur

80 °C: 0, 4, 16, 24, 48, 72, 144, 192, 312 in 480 ur

Časovne točke vzorčenja po posameznih temperaturah pri pH 6,8:

40 °C: 0, 4, 16, 24, 48, 72, 144, 192, 312 in 480 ur

60 °C: 0, 4, 16, 24, 48, 72, 144, 192, 312 in 480 ur

80 °C: 0, 4, 16, 24, 48, 72 in 144 ur

Časovne točke vzorčenja po posameznih temperaturah pri pH 12,0:

40 °C: 0, 10, 20, 30, 65, 130, 185 in 270 minut

60 °C: 0, 15, 30, 45, 70, 80, 95, 105 in 125 minut

80 °C: 0, 10, 20, 30, 40 in 50 minut

3.2.2 UPORABA MASNE SPEKTROMETRIJE

Analizo vzorcev smo izvajali na masnem spektrometru Varian 1200L s kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Kot vir ionizacije smo uporabili pozitivni ESI način.

3.2.2.1 Pogoji MS sistema

- Igla: 5000 V
- Ščitek pred vstopom v kapilaro: 600 V
- Sušilni plin dušik: 350 °C, 21 Psi
- Kolizijski plin argon: 1,76 mTorr
- Napetost na detektorju: 1300 V
- Izbrano območje mas: 70–380 m/z
- Dovajanje vzorca z infuzijsko črpalko Harvard Aparatus 11 Plus (hitrost 0,04 mL/min)

3.2.2.2 Pogoji LC-MS sistema

- Kromatografska kolona: Synergi Hydro (kolona 1), 4 μ m, 250 x 4,6 mm
- Mobilna faza: 70 % mravljična kislina in 30% metanol
- Ostali kromatografski pogoji enaki kot pri metodi za vrednotenje v poglavju 3.2.1.2.
- Izbrano območje mas: 90–360 m/z
- Ostali pogoji na MS sistemu so enaki kot pri MS sistemu v poglavju 3.2.2.1.

Priprava vzorčnih raztopin za MS/MS analizo

Za identifikacijo razpadnih produktov z MS/MS analizo smo uporabili 6 frakcij zbranih med analizo 1. in 2. delovne raztopine po optimizirani metodi III (70 % TFA / 30 % ACN, kolona: Kromasil C₁₈ – kolona 2, temperatura 25 °C).

Časovni potek pridobivanja frakcij je naveden v Tabeli V. Frakcije smo zbirali v 6 časovnih intervalih; začetek zbiranja označuje retencijski čas t_{r1} , konec zbiranja pa t_{r2} . Frakcije F1, F2 in F3 pripadajo vzorcu 1. delovne raztopine (v 0,1 M HCl) inkubirane 168 ur pri 80 °C; frakcije F4, F5 in F6 pa pripadajo vzorcu 2. delovne raztopine (v destilirani vodi) inkubirane 168 ur pri 80 °C.

Tabela V: Časovni potek pridobivanja HPLC frakcij

<i>Frakcija</i>	$t_{r1}-t_{r2}$
<i>F1</i>	2,3–2,5 min
<i>F2</i>	3,8–4,1 min
<i>F3</i>	10,6–11,2 min
<i>F4</i>	1,8–2,2 min
<i>F5</i>	2,7–3,0 min
<i>F6</i>	3,1–3,8 min

Frakcije smo morali pred analizo redčiti: v vialo smo z avtomatsko pipeto prenesli 300 μ L frakcije in dodali 300 μ L metanola ter 300 μ L 0,1 % raztopine mravljične kisline. Vzorec smo v MS sistem dovajali z injekcijsko brizgo.

Priprava vzorčnih raztopin za LC-MS/MS analizo

Za potrditev razpadnih produktov z LC-MS smo analizirali:

- vzorec 1. osnovne raztopine v stabilnostni študiji (pH 2,0, 80 °C, vzorčen po 312 h)
- vzorec 2. osnovne raztopine v stabilnostni študiji (pH 6,8, 40 °C, vzorčen po 480 h)
- vzorec 100 % raztopine za umeritveno premico shranjen 168 ur v hladilniku
- mobilno fazo (0,1 % mravljična kislina : metanol = 70 : 30 v/v)

Vzorcev pred analizo ni bilo potrebno redčiti oz. posebej pripraviti.

Priprava mobilne faze

- *Mobilna faza mravljična kislina / metanol*

Mobilna faza je bila sestavljena iz 70 v/v % 0,1 % raztopine mravljične kisline, ostalih 30 v/v % je bil metanol. Raztopino mravljične kisline smo pripravili tako, da smo 1 L bidestilirane vode z avtomatsko pipeto dodali 1 mL mravljične kisline (FA). Izmerili smo pH raztopine, ki je znašal 2,87. Raztopino smo pred uporabo razplinili.

3.2.3 OBDELAVA PODATKOV

Rezultate HPLC analize smo obdelali s pomočjo programske opreme Excel. Program ima zmogljiva orodja za računanje in izdelavo grafov. Na ta način smo z metodo linearne regresije določili enačbo umeritvene premice, hitrostne konstante, izvedli izračune validacije HPLC metode ter izrisali grafe, ki sledijo v poglavju 4. Rezultati in razprava.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE

Razvoj metod je šel v dve smeri: v smer optimizacije metode za kvalitativno določitev razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov ter v smer optimizacije metode za kvantitativno določitev. Kromatografski pogoji razvojnih metod so opisani v poglavju 3.2.1.1. Optimizacija metod.

Optimizacija metode za kvalitativno določitev

Cilj razvite HPLC metode je bila zadostna separacija vrhov komponent vzorca, ki je omogočila odvzem frakcij vrhov razvojnega »prila« in obeh njegovih razpadnih produktov ter hkrati neposredna uporaba teh frakcij na MS/MS sistemu, ker smo želeli pred stabilnostno študijo razpadne produkta razvojnega »prila« identificirati.

Metoda I

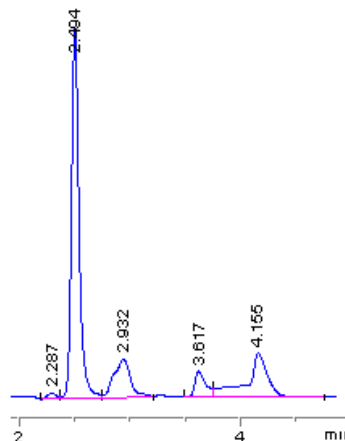
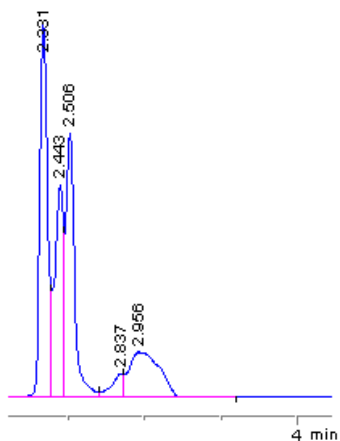
Razvoj analizne metode smo začeli s ciljem, da bo metoda kompatibilna z MS/MS sistemom. Izbor kolone, mobilne faze in stacionarne faze smo tako prilagodili zahtevam MS/MS sistema. Uporabili smo kolono 1 (Synergi Hydro-RP) in amonijev acetat / acetonitril kot mobilno fazo. Analizo smo izvajali pri sobni temperaturi, valovna dolžina UV detektorja je bila 215 nm. Analizo smo začeli z gradientno elucijo (40–90 % ACN in 10–30 % ACN). Kromatogrami so pokazali, da imamo opravka z zelo polarno substanco, saj se je analit eluiral po približno 2–3 minutah.

Nadalje je izokratska analiza (30 % AmAc / 70 % ACN) pokazala, da prihaja do sprememb v vzorcu 3. delovne raztopine (0,1 M NaOH). Kromatograma vzorca shranjenega pri sobni temperaturi in vzorca inkubiranega pri 80 °C sta namreč pokazala, da prihaja do nastanka bolj polarne spojine, saj se poleg predvidenega vrha analita (t_r 2,0 min) pojavi še en vrh (t_r 1,9 min). Predvidevali smo, da prihaja do hidrolize razvojnega »prila« do rLAT-a. Vrh je bil v primeru vzorca inkubiranega pri 80 °C višji kot pri vzorcu shranjenem pri sobni T, kar smo si razlagali z morebitnim hitrejšim potekom hidrolize pri višji temperaturi. Vrhova nista bila ločena, bila sta razcepljena le na vrhu, tako da smo razvoj metode nadaljevali.

Metoda II

Uporabili smo kolono 1 in trifluoroocetno kislino / acetonitril kot mobilno fazo. Analizo smo izvajali pri sobni temperaturi, valovna dolžina UV detektorja je bila 215 nm.

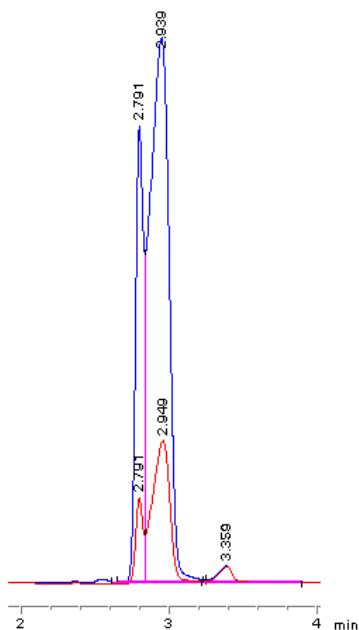
Analizo smo začeli z gradientno elucijo (30–60 % ACN). Kromatogrami so pokazali, da je smotrno opravljati analizo pri še nižjem deležu ACN. Vrhovi so imeli daljše retencijske čase kot pri Metodi I, saj TFA (CF_3COO^-) deluje kot »ion pairing« reagent (42) in tako z bazičnim centrom razvojnega »prila« ($-\text{NH}_2^+$) tvori ionski par navzven manj polaren, zaradi česar se je podaljšal čas retencije in je prišlo tudi do ločitve vrhov, ki so bili pri prejšnji metodi skriti v enem vrhu. Kromatogram vzorca 3. delovne raztopine (Slika 7) je ponovno pokazal, da v bazičnem prihaja do nastanka bolj polarne spojine, saj se je pred razcepljenim vrhom analita (t_r 2,4 min in 2,5 min) pojavil še en vrh (t_r 2,3 min), ki pa ponovno ni ločen od domnevnega vrha analita. Kromatograma vzorcev 1. (Slika 8) in 2. delovne raztopine nista izkazovala cepitve najvišjega vrha; pri obeh kromatogramih pa smo opazili dva vrhova povezana med seboj (t_r 3,6 in 4,2 min), kar je lahko značilno za vrhova cis/trans izomer kot v članku navaja Trabelsi s sodelavci. V študiji so namreč potrdili vpliv pH, temperature in modifikatorjev na ločitev cis/trans izomer, ki nastanejo zaradi omejene rotacije okoli amidne vezi pri enalaprilu. (43)



Slika 7: Kromatogram 3. delovne raztopine Slika 8: Kromatogram 1. delovne raztopine
(30–60 % ACN / TFA; 25 °C; kolona 1)

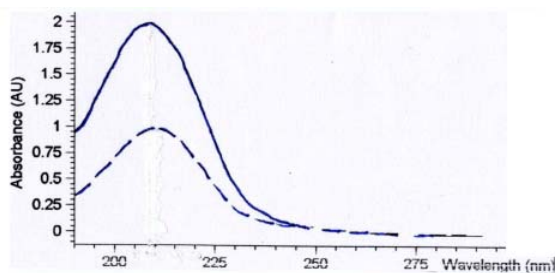
Nadaljevali smo z izokratsko analizo (85 % TFA / 15 % ACN). Vrhova pri t_r 3,6 in 4,2 min (Slika 8) sta postala bolj razvlečena, z nadaljnjim nižanjem odstotka ACN (5 % in 0 %) pa sta se popolnoma skrila v bazni liniji.

Pri teh pogojih smo analizirali tudi vzorec maleinske kisline in ugotovili, da prvi razcepljeni vrh na kromatogramih ($t_r = 2,8$ in $2,9$ min) vključuje maleat, ki je kot sol prisoten v vzorcu razvojnega »prila« (Slika 9).



Slika 9: Kromatogram 2. delovne raztopine (modra) in vzorca maleinske kisline (rdeča črta) (85 % TFA / 15 % ACN; 25 °C; kolona 1)

Želeli smo potrditi našo domnevo, da smo na kromatogramih opazovali vrh maleata, zato smo na UV spektrofotometru izmerili UV spektra vzorca maleinske kisline in redčenega vzorca 2. delovne raztopine razvojnega »prila«; koncentracija obeh je bila 0,05 mg/mL. Analiza je pokazala, da absorpcijska maksimuma maleata in razvojnega »prila« sovpadata (Slika 10). Maksimalno absorbanco smo pri obeh raztopinah izmerili pri valovni dolžini med 207 in 210 nm. Predvidevali smo, da v vzorcu razvojnega »prila« zaznamo maleinsko kislino, ki namreč dobro absorbira UV svetlobo zaradi prisotnosti dvojnih vezi kot kromofornega sistema.



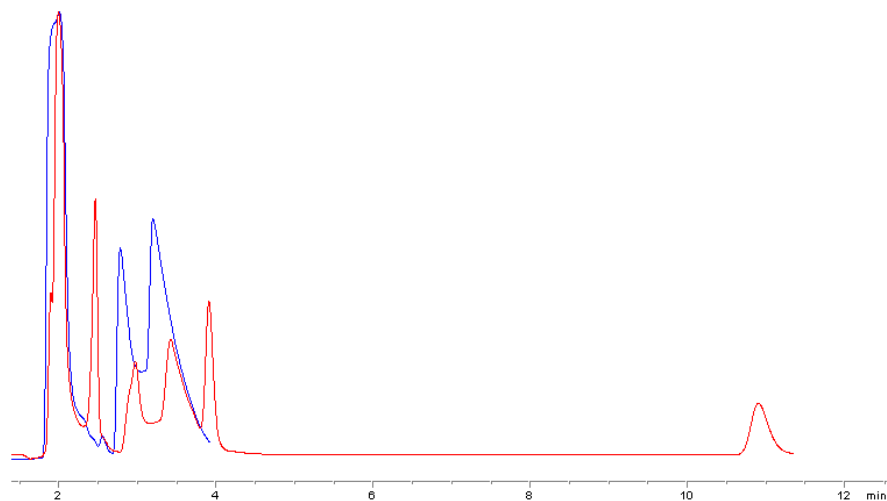
Slika 10: UV spektra 2. delovne raztopine (polna črta) in vzorca maleinske kisline (črtkana črta)

Metoda III

V nadaljevanju smo se odločili za zamenjavo kolone. Ker je kolona 1 posebna C₁₈ kolona primerna za analizo specifičnih substanc, smo preizkusili še klasično C₁₈ kolono. Želeli smo namreč potrditi, da zamenjava kolone 1 s kolono 2, katere uporabo smo načrtovali za razvoj metode za stabilnostno študijo, ne vpliva bistveno na položaj vrhov analitov ter na njihovo ločljivost.

Uporabili smo kolono 2 (Kromasil C₁₈) in trifluoroocetno kislino / acetonitril kot mobilno fazo. Koloni smo med seboj primerjali tako, da smo pri Metodi III uporabili iste pogoje kot pri Metodi II. Retencijski časi posnetih kromatogramov so bili zelo podobni in ločljivost primerljiva.

Izvedli smo izokratsko analizo (70 % TFA / 30 % ACN). Ponovno sta se pri kromatogramih 1. in 2. delovne raztopine pojavila razpotegnjena vrhova. Prvič sta se pojavila dodatna vrhova pri 1. delovni raztopini, in sicer pri 3,9 in 10,9 min (Slika 11).



Slika 11: Kromatograma 1. (rdeča) in 2. (modra črta) delovne raztopine (70 % TFA / 30 % ACN; 25 °C; kolona 2)

S tem smo zaključili optimizacijo metode, saj smo uspeli ločiti vrhove vseh komponent vzorca: maleata (t_r 2,0 min), razvojnega »prila« (t_r 2,8 in 3,2 min), rLAT (t_r 2,4 min) in rDKP (t_r 10,9 min). Z zadovoljivo ločitvijo komponent in hkrati pojavom vrha diketopiperazinskega razpadnega produkta je bil izpolnjen pogoj za lovljenje frakcij teh vrhov ter njihovo kasnejšo kvalitativno določitev na MS/MS sistemu.

Optimizacija metode za kvantitativno določitev

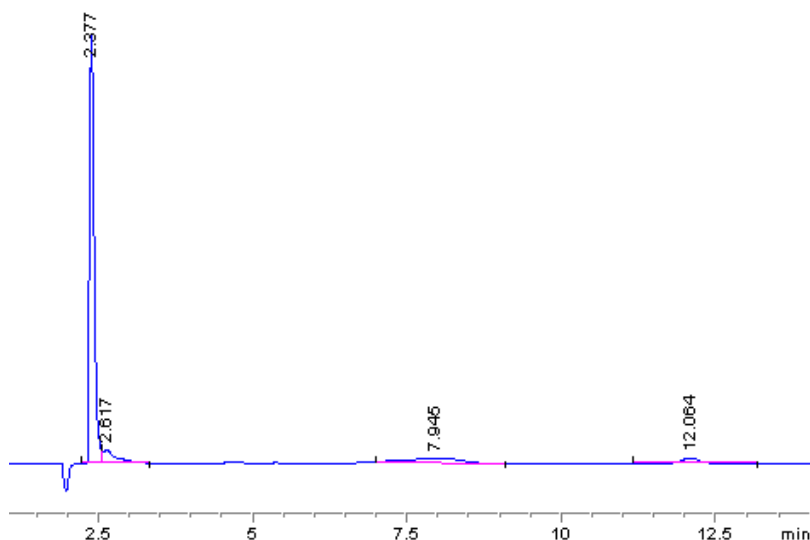
Po identifikaciji spojin je sledil še razvoj metode za kvantitativno določitev za uporabo v stabilnostni študiji. Optimizacijo metode za kvantitativno določitev smo izvedli preko dveh razvojnih metod. Analize prve metode smo izvedli na HPLC sistemu 1, analize druge razvojne metode pa so potekale na HPLC sistemu 2.

Metoda Ia

Kot izhodišče razvoja metode primerne za kvantifikacijo spojin nam je služila metoda za substanco ramipril, katero smo samo malenkostno modificirali (44). Uporabili smo kolono 2 in trietilamin / metanol kot mobilno fazo. Analizo smo izvajali pri 40 °C, valovna dolžina UV detektorja je bila 215 in 225 nm. Z nižanjem odstotka MeOH v mobilni fazi se je izboljševala ločitev vrha maleata in »prila«. Preko več izokraskih analiz (od 20 % TEA / 80 % MeOH do 75 % TEA / 25 % MeOH) smo ugotovili, da se vrhova najbolje ločita pri sestavi 70 % TEA / 30 % MeOH. Trietilamin ($-\text{NH}^+=$) ima funkcijo »ion pairing« reagenta (45) enako kot TFA, saj tvori ionski par s kislim centrom razvojnega »prila« ($-\text{COO}^-$).

Pri tej sestavi mobilne faze smo izvedli analizo z valovno dolžino detekcije analita 225 nm. Opazili smo le zmanjšanje površine vrhov, kar je posledica oddaljevanja vrednosti valovne dolžine detektorja od valovne dolžine, pri kateri imata razvojni »pril« in maleat absorpcijski maksimum in je zato odziv manjši. Ker ni bilo opaznega izboljšanja ločitve vrhov rLAT-a in maleata, smo analizo nadaljevali pri valovni dolžini 215 nm.

S pomočjo analiz staranih vzorcev smo predvidevali, da gre najverjetneje za naslednje spojine: t_r maleata 2,4, t_r rLAT-a 2,6, t_r »prila« 7,9 in t_r rDKP-ja 12,1 min (Slika 12).

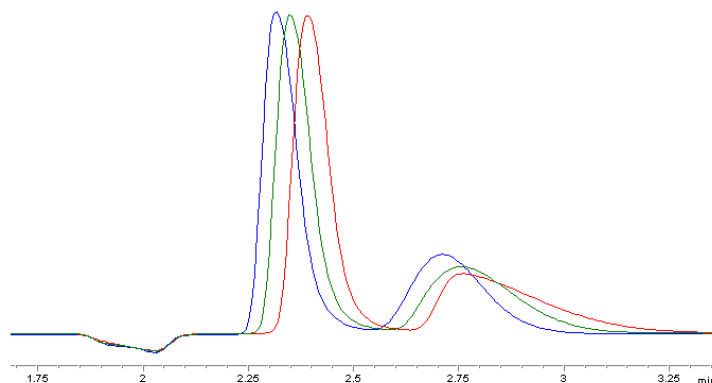


Slika 12: Kromatogram 1. delovne raztopine (70 % TEA / 30 % MeOH; 40 °C; kolona 2)

Metoda IIa

V prejšnji metodi smo ugotovili, da ima temperatura pomemben vpliv na ločitev vrhov. Uporabili smo HPLC sistem 2, ki ima vgrajen termostat za kolono in nam je tako omogočal natančnejše uravnavanje temperature in doseganje visokih temperatur s pomočjo programske opreme. Poleg tega nam je HPLC sistem 2 omogočal tudi hlajenje vzorcev pred in med analizo. Določeni vzorci so pred analizo čakali v avtomatskem vzorčevalniku tudi do nekaj ur, v tem času bi pri sobni temperaturi prihajalo do razpada razvojnega »prila« in posledično do neverodostojnih rezultatov stabilnostne študije.

Uporabili smo kolono 2 in 70 % TEA / 30 % MeOH kot mobilno fazo. Valovna dolžina UV detektorja je bila 205 in 215 nm. Analize smo izvajali pri različnih temperaturah v intervalu med 40 °C in 60 °C, pri čemer smo temperaturo povečevali za 5 °C. S tem pristopom smo zagotovili zadostno ločitev vrha maleata in rLAT-a, kar je razvidno iz Slike 13, saj smo imeli probleme le z ločitvijo vrhov teh dveh komponent. Slika 13 prikazuje vpliv temperature na položaj vrhov 1. delovne raztopine: pri 55 °C je t_r maleata 2,3 in t_r rLAT-a 2,7 min; pri 45 °C je t_r maleata 2,4 in t_r rLAT-a 2,75 min. Zviševanje temperature je povzročilo oženje kromatografskih vrhov in s tem boljšo ločitev vrhov.



Slika 13: Vpliv temperature na ločitev vrhov maleata in rLAT-a; 55 °C (modra), 50 °C (zelena), 45 °C (rdeča črta)

Primerjali smo tudi rezultate izmerjene pri 205 in 215 nm. Odločili smo se, da bomo v stabilnostni študiji uporabili podatke pridobljene pri 215 nm, saj je bil šum pri 205 nm preveč moteč kljub siceršnjemu boljšemu odzivu – razmerje signal / šum je bilo namreč boljše pri višji valovni dolžini.

Razvita analizna metoda je omogočala ločitev vrhov vseh komponent vzorca ter njihovo kvantitativno določitev, zato smo jo po validaciji uporabili v stabilnostni študiji.

Validacija metode

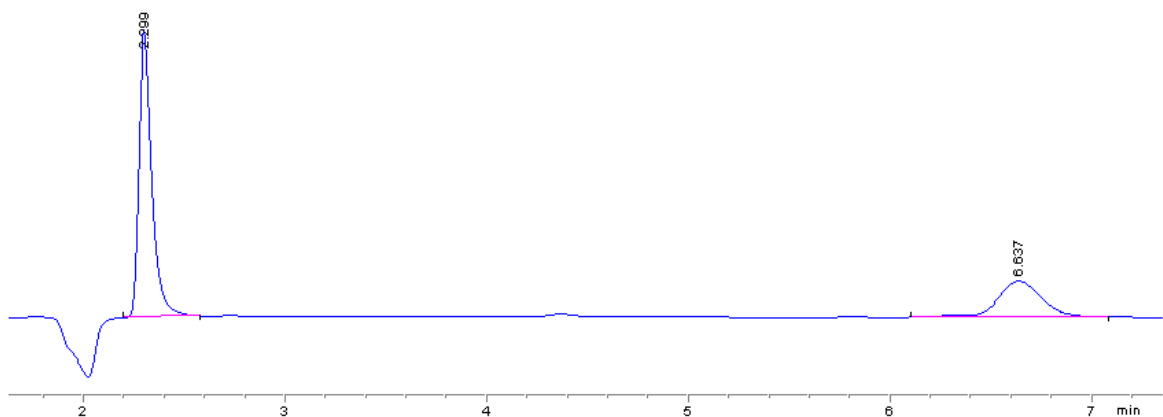
Z validacijo metode smo želeli potrditi stabilnostno indikativnost metode ter s tem potrditi primernost optimizirane metode za kvantifikacijo razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov. Metodologija validacije je podrobneje opisana v poglavju 3.2.1.2. Vrednotenje HPLC analizne metode.

Selektivnost metode smo preverili s primerjavo kromatogramov mobilne faze, standardne raztopine razvojnega »prila«, maleinske kisline ter kromatogramom, kjer sta vidna oba razpadna produkta. Slika 14 prikazuje kromatogram mobilne faze uporabljene v stabilnostni študiji. V bližini vrhov razvojnega »prila« in rLAT-a ni prisotnih drugih vrhov.



Slika 14: Kromatogram mobilne faze (70 % TEA / 30 % MeOH, 60 °C, kolona 2)

Slika 15 prikazuje kromatogram standardne raztopine razvojnega »prila« s koncentracijo 0,1 mg/mL. Vrhova razvojnega »prila« in maleata sta ločena.

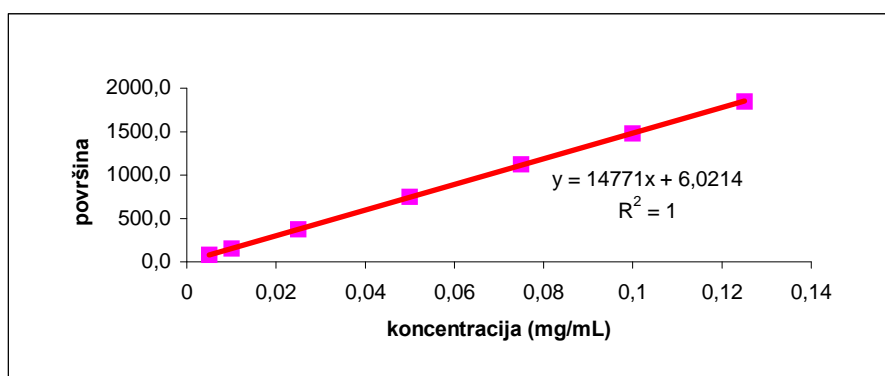


Slika 15: Kromatogram standardne raztopine razvojnega »prila« s koncentracijo 0,1 mg/mL

Selektivnost metode potrjuje tudi Slika 13, iz katere je razvidno, da sta tudi vrhova maleata in rLAT-a med seboj ločena. Zagotovili smo tudi ločitev vrhov rDKP-ja, rLAT-a in razvojnega »prila«, kar je razvidno v nadaljevanju iz Slike 17, kjer so pri stresnih pogojih (pH 2,0, 80 °C) po 480 urah v vzorcu prisotni razvojni »pril« in oba razpadna

produkta. Retencijski časi komponent vzorca so bili: t_r (maleat) 2,3 min, t_r (rLAT) 2,7 min, t_r (razvojni »pril«) 6,6 min in t_r (rDKP) 9,6 min. Z optimizacijo metode smo dosegli ustrezno selektivnost metode, in sicer ločitev vrhov razvojnega »prila«, rLAT in rDKP.

Linearnost meritev je predstavljena na Sliki 16, ki prikazuje umeritveno premico standardnih raztopin, ki so točno definirane v poglavju 3.2.1.2. Vrednotenje HPLC analizne metode. Vrednost izračunanega determinacijskega koeficienta je bila večja od 0,9900. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo linearnost razvite metode v koncentracijskem območju od 0,005–0,125 mg/mL.



Slika 16: Umeritvena premica razvojnega »prila«

Točnost in natančnost meritev standardne raztopine za umeritveno premico prikazuje Tabela VI. Točnost metode je primerna, saj so dobljeni parametri znotraj definiranih specifikacijskih mej 95,0 do 105,0 % z ozirom na delovno koncentracijo. Natančnost injiciranja je primerna le v koncentracijskem območju od 0,025–0,125 mg/mL, saj vrednost RSD le tu ni preseгла 5,0 %. Rezultati meritev pri koncentracijah 0,005 mg/mL in 0,01 mg/mL ne ustrezajo našim pogojem natančnosti. Kljub temu lahko rečemo, da je natančnost metode ustrezna, saj koncentracijski razpon 25,0–125,0 % zadostuje našim potrebam. Z analizo metodo bomo namreč določali vsebnost razvojnega »prila«, kjer bomo imeli opravka z višjimi vsebnostimi razvojnega »prila«.

Tabela VI: Točnost in natančnost HPLC metode izražena v odstotkih

<i>Koncentracija</i>	<i>Točnost (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
5,0 %	96,3	11,1
10,0 %	99,4	6,6
25,0 %	99,8	1,4
50,0 %	100,4	1,9
75,0 %	100,6	0,5
100,0 %	99,9	1,2
125,0 %	99,8	0,4

Mejo detekcije (LOD) in mejo kvantifikacije (LOQ) našega analiznega sistema smo določili po ICH smernicah. S pomočjo enačb navedenih v poglavju 3.2.1.2. Vrednotenje HPLC analizne metode smo izračunali vrednosti meje detekcije pri 0,00033 mg/mL (0,3 % raztopina) in mejo kvantifikacije pri 0,00101 mg/mL (1,0 % raztopina). Meja detekcije je za naše pogoje sprejemljiva, saj je vrednost manjša od 1,0 %. Prav tako je sprejemljiva meja kvantifikacije, saj je vrednost manjša od 5,0 %.

Na podlagi dobljenih rezultatov vrednotenja smo potrdili ustreznost analizne metode za nadaljnje delo.

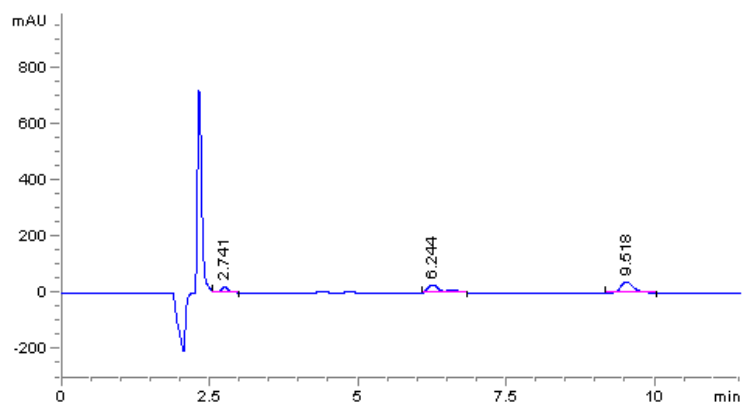
4.2 ŠTUDIJA STABILNOSTI RAZVOJNEGA »PRILA«

Izvedli smo študijo stabilnosti raztopin razvojnega »prila«, katerih priprava je opisana v poglavju 3.2.1.3. Stabilnostna študija. Vzorčili smo po programu (časovne točke), ki je natančno opisan v istem poglavju. Verodostojnost podatkov smo potrdili z delno validacijo metode, ki je opisana v poglavju 3.2.1.2. Vrednotenje HPLC analizne metode.

4.2.1 VPLIV pH IN TEMPERATURE

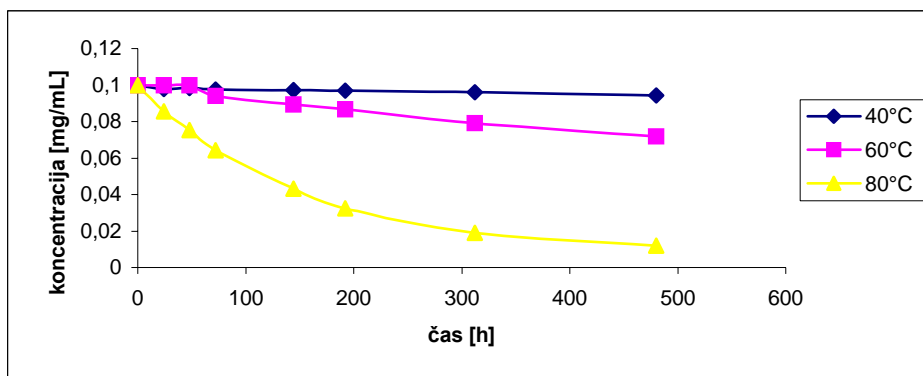
Med najpomembnejše dejavnike, ki vplivajo na stabilnost zdravilnih učinkovin v raztopini spadata pH in temperatura. Z namenom ugotoviti vpliv teh dveh dejavnikov smo stabilnostno študijo izvajali v treh pH-jih (2,0, 6,8 in 12,0) ter pri treh temperaturah (40, 60 in 80 °C).

V kisli raztopini razvojnega »prila« (pri pH 2,0) je po 480 urah prišlo do nastanka obeh razpadnih produktov. Slika 17 prikazuje HPLC kromatogram, ki kaže precejšen nastanek rDKP s t_r 9,5 min ter nekoliko manjši nastanek rLAT-a s t_r 2,7 min.



Slika 17: Kromatogram 0,1 mg/mL raztopine razvojnega »prila« v pH 2,0 po 480 urah pri 80 °C

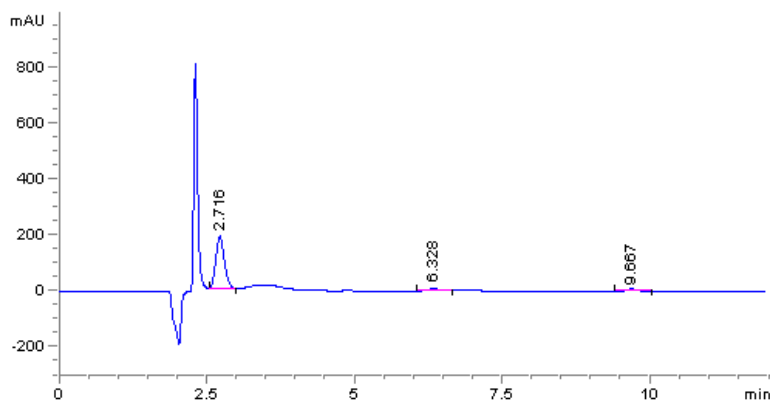
Slika 18 prikazuje vpliv temperature na razpad razvojnega »prila« pri pH 2,0. V vzorcu pri temperaturi 40 °C skoraj ni sprememb v vsebnosti, medtem ko je pri 80 °C po 48 urah razpadla približno četrtina začetne koncentracije razvojnega »prila«, po 100 urah pa že približno polovica razvojnega »prila«.



Slika 18: Prikaz časovnega poteka vsebnosti razvojnega »prila« koncentracije 0,1 mg/mL pri pH 2,0 pri treh temperaturah

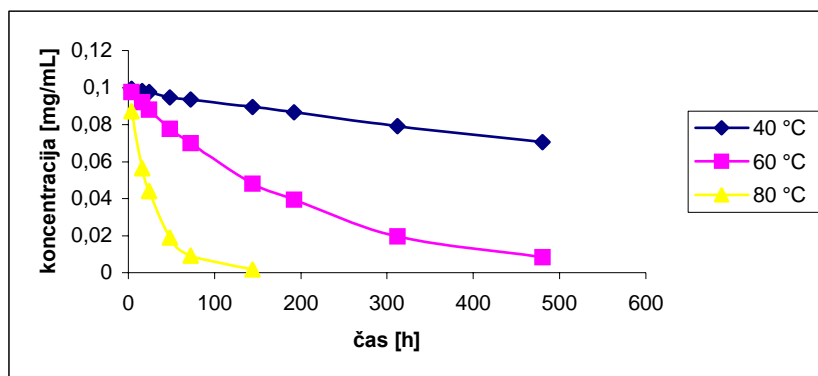
Če povzamemo Sliki 17 in 18 lahko sklepamo, da v kisli raztopini nastane iz razvojnega »prila« v glavnem razpadni produkt rDKP.

V nevtralni raztopini razvojnega »prila« (pri pH 6,8) nastaja rDKP v zelo majhnem obsegu šele po 192 urah pri 80 °C, razgradnja gre predvsem v smer nastanka rLAT-a, kar je razvidno iz Slike 19.



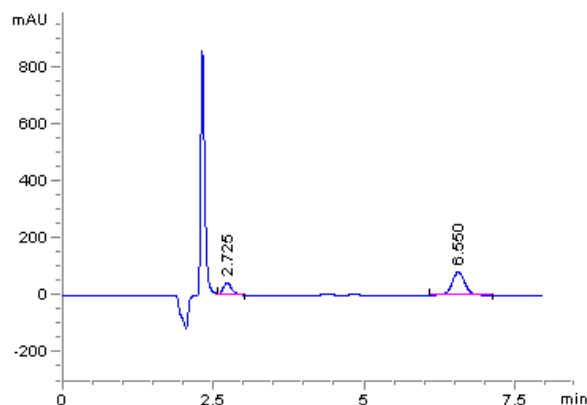
Slika 19: Kromatogram 0,1mg/mL raztopine razvojnega »prila« v pH 6,8 po 192 urah pri 80 °C

Slika 20 prikazuje potek razgradnje pri pH 6,8 pri različnih temperaturah. Razgradnja v nevtralnem je hitrejša kot v kislem. Pri temperaturi 80°C in po približno 50 urah je v vzorcu le še približno petina začetne koncentracije razvojnega »prila«. Razvojnega »prila« ostane pri temperaturi 60°C po 144 urah le še polovica.



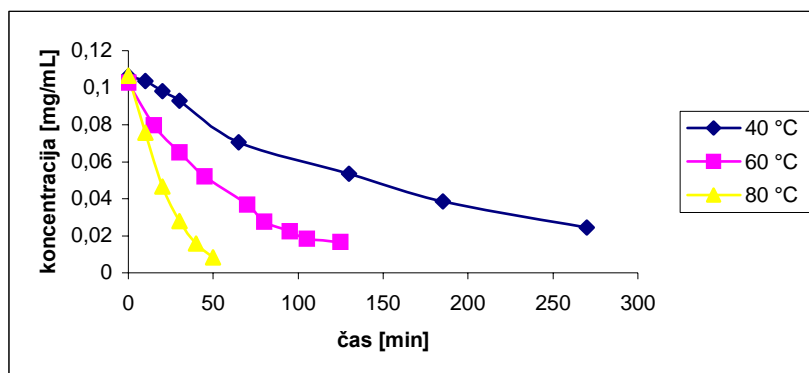
Slika 20: Prikaz časovnega poteka vsebnosti razvojnega »prila« koncentracije 0,1 mg/mL pri pH 6,8 pri treh temperaturah

V bazični raztopini razvojnega »prila« (pri pH 12,0) nastaja le rLAT, in sicer pri temperaturi 80 °C že po 10 minutah, kar prikazuje Slika 21. Zaradi hitrega razpada smo vzorčili v krajših časovnih intervalih (minutah), kar je natančno opisano v poglavju 3.2.1.3. Stabilnostna študija.



Slika 21: Kromatogram 0,1mg/mL raztopine razvojnega »prila« v pH 12,0 po 10 minutah pri 80 °C

Slika 22 prikazuje vpliv temperature na razgradnjo razvojnega »prila« pri pH 12,0. Proces razgradnje je v bazičnem mediju najhitrejši, saj pri temperaturi 80 °C že po 50 minutah razvojnega »prila« skoraj ni več. Celó pri temperaturi 40 °C je po 130 minutah ostala le še polovica začetne koncentracije razvojnega »prila« v vzorcu.



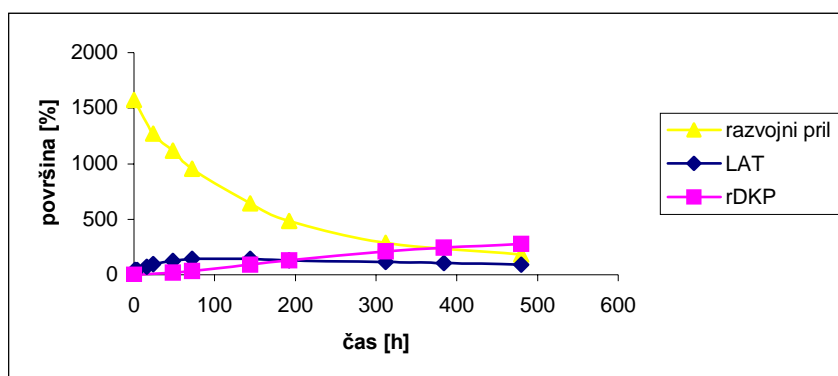
Slika 22: Prikaz časovnega poteka vsebnosti razvojnega »prila« koncentracije 0,1 mg/mL pri pH 12,0 pri treh temperaturah

Primerjava Slik 21 in 22 nam pove, da se v zelo bazičnem razvojni »pril« zelo hitro hidrolizira do rLAT-a.

Na podlagi Slik 18, 20 in 22 lahko sklepamo, da se z višanjem pH in temperature vsebnost razvojnega »prila« vse hitreje zmanjšuje. Iz Slik 17, 19 in 21 lahko sklepamo, da v kisli raztopini nastajata rLAT in rDKP, pri visoki temperaturi prevladuje nastanek rDKP; v nevtralnem predvsem rLAT, medtem ko v bazičnem pa nastaja le rLAT.

4.2.2 DOLOČITEV REDA IN KINETIKE REAKCIJE

Na podlagi podatkov dobljenih s HPLC analizo smo grafično ponazorili časovni potek razgradnje razvojnega »prila« in nastanek obeh razpadnih produktov v pH 2,0 in pri 80 °C kot prikazuje Slika 23. Za izris grafa smo namesto koncentracij uporabili deleže površin vrhov kromatograma, saj standardi razpadnih produktov, ki bi nam omogočili preračun v koncentracije, niso bili na voljo. Potek nastanka obeh razpadnih produktov je sledeč: rDKP ves čas nastaja s konstantno hitrostjo, prav tako rLAT, katerega vsebnost pa začne po 192 urah pri 80 °C v pH 2,0 upadati, medtem ko se količina rDKP še vedno povečuje. Iz grafa lahko sklepamo, da razpad poteka po kinetiki prvega reda ter da gre za kompetitivni razpad razvojnega »prila«, saj nastajata dva razpadna produkta po različnih poteh. Reakcija nastanka rLAT-a je konsekutivna reakcija, saj količina rLAT-a po določenem času začne upadati, ker najverjetneje prihaja do nastanka sekundarnega razpadnega produkta. Le-tega z našo analizo metodo nismo detektirali.



Slika 23: Časovni potek razgradnje razvojnega »prila« in nastanek obeh razpadnih produktov v pH 2,0 in pri 80 °C

Natančno določitev reda reakcije smo izvedli s t.i. substitucijsko metodo, kjer smo v integrirane oblike enačb ničelnega, prvega in drugega reda vnesli eksperimentalne podatke HPLC analize in v Excelu, na osnovi linearne regresije, določili enačbe premic. Izbrali smo tisti red reakcije, ki je kot rezultat analize eksperimentalnih podatkov podal najvišji determinacijski koeficient (r^2). Konstante reakcijske hitrosti smo nato določili iz enačbe, ki velja za ugotovljeni red. V primeru razvojnega »prila« smo določili prvi red kot najboljši približek razgradnje. Z logaritmiranjem (naravni logaritem) vrednosti koncentracij

razvojnega »prila« v odvisnosti od časa pri vseh treh pH-jih (2,0, 6,8 in 12,0) ter pri vseh treh delovnih temperaturah (40, 60 in 80 °C), smo dobili enačbe premice. V enačbi premice za prvi red y predstavlja naravni logaritem koncentracije, x pa čas. Vrednosti so prikazane v Tabeli VII.

Tabela VII: Enačbe premic, determinacijski koeficienti in vrednosti hitrostnih konstant razvojnega »prila«, dobljene po enačbi $\ln(c) = \ln(c_0) - k \times t$

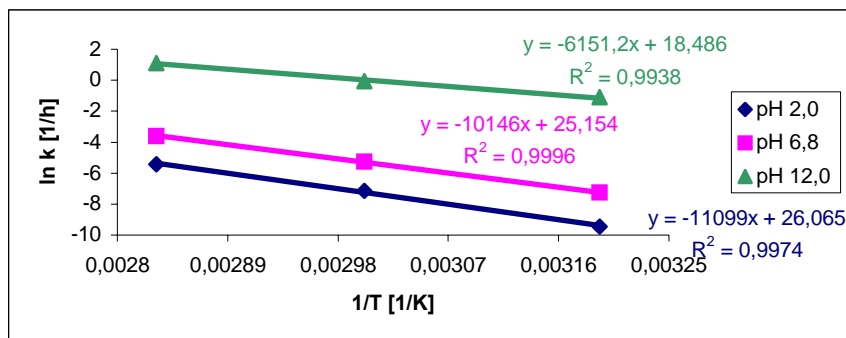
pH	T	ENAČBA PREMICE	r^2	VREDNOST HITROSTNE KONSTANTE (h^{-1})
pH 2,0	40 °C	$y = -0,00008x + 4,5931$	0,9723	0,00008
	60 °C	$y = -0,0008x + 4,6108$	0,9717	0,0008
	80 °C	$y = -0,0044x + 4,4989$	0,9766	0,0044
pH 6,8	40 °C	$y = -0,0007x + 4,5945$	0,9975	0,0007
	60 °C	$y = -0,0052x + 4,6108$	0,9993	0,0052
	80 °C	$y = -0,0279x + 4,188$	0,9878	0,0279
pH 12,0	40 °C	$y = -0,0055x + 4,5845$	0,9972	0,3300
	60 °C	$y = -0,0154x + 4,5472$	0,9903	0,9240
	80 °C	$y = -0,0512x + 4,7036$	0,9913	3,0720

Iz naklona premice določimo hitrostno konstanto reakcije. Visok determinacijski koeficient potrjuje prvi red reakcije.

Ugotovili smo, da je pri vseh treh pH-jih pri višji temperaturi višja hitrostna konstanta, kar pomeni višjo hitrost reakcije. Podobno povezavo lahko najdemo tudi med tremi pH-ji pri enaki temperaturi, kjer so pri pH 2,0 hitrostne konstante pri določeni temperaturi nižje kot pri pH 6,8 in le-te nižje kot pri enakih temperaturah v zelo bazičnih pogojih. Torej višji kot je pH, višja je vrednost hitrostne konstante.

Na podlagi rezultatov stabilnostnih študij lahko določimo pogoje shranjevanja substance. Najpogosteje so pogoji shranjevanja pri sobni temperaturi (25 °C). Z uporabo Arrheniusovih premic smo tako izračunali vrednosti hitrostnih konstant pri 25 °C. Iz naklona premic smo izračunali aktivacijske energije reakcij.

Slika 24 prikazuje izrisane Arrheniusove premice z enačbami premic in determinacijskimi koeficienti razvojnega »prila« v raztopinah s tremi različnimi pH-ji, na podlagi katerih smo izračunali vrednosti v Tabeli VIII.



Slika 24: Arrheniusove premice pri treh različnih pH-jih

Izračunane hitrostne konstante pri sobni temperaturi (25 °C), prikazane v Tabeli VIII, nam povedo, da je hitrost razgradnje razvojnega »prila« najmanjša v kislem (pH 2,0), v nevtralnem (pH 6,8) razpada razvojni »pril« približno 10-krat hitreje, medtem ko je hitrost razgradnje v bazičnem (pH 12,0) največja, saj razgradnja poteka skoraj 10-tisočkrat hitreje kot v kislem.

V Tabeli VIII lahko vidimo, da ima temperatura največji vpliv na hitrost razgradnje pri pH 2,0 in nato z naraščanjem pH-ja pada, saj ima aktivacijska energija (E_a) pri pH 2,0 najvišjo vrednost.

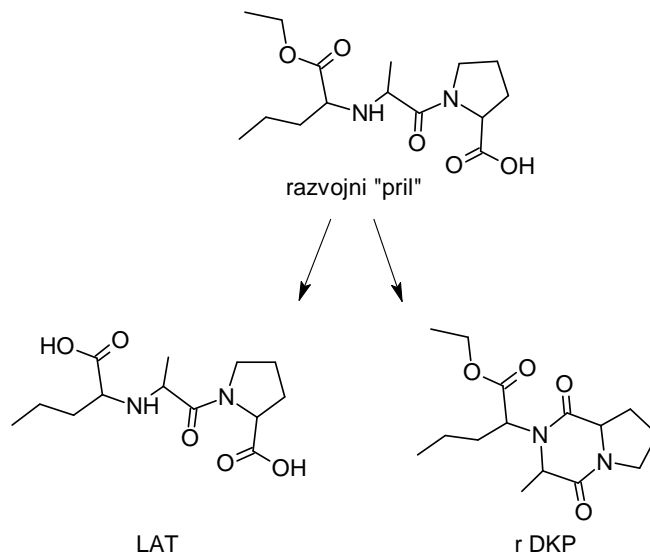
Tabela VIII: Izračunane vrednosti aktivacijskih energij, frekvenčnih faktorjev in hitrostnih konstant pri 25 °C pri vseh treh pH-jih

pH	AKTIVACIJSKA ENERGIJA (kJ/mol)	FREKVENČNI FAKTOR (h^{-1})	HITROSTNA KONSTANTA PRI 25 °C (h^{-1})
2,0	92,3	$2,10 \times 10^{11}$	0,000014
6,8	84,4	$8,41 \times 10^{10}$	0,000137
12,0	51,1	$1,07 \times 10^8$	0,116000

Na podlagi HPLC podatkov stabilnostne študije lahko zaključimo, da smo ugotovili 1. red reakcije razgradnje razvojnega »prila«, kjer v kislem nastaja v glavnem diketopiperazinski derivat (rDKP) in v nevtralnem ter bazičnem rLAT.

4.3 DOLOČITEV MEHANIZMA RAZPADA RAZVOJNEGA »PRILA«

Predvidevali smo razpad razvojnega »prila« na način kot poteka razpad večine ACE inhibitorjev: hidroliza etilnega estra do prilata (rLAT) in intraciklizacija do diketopiperazinskega derivata (rDKP). Strukture nastalih razpadnih produktov prikazuje Slika 25.

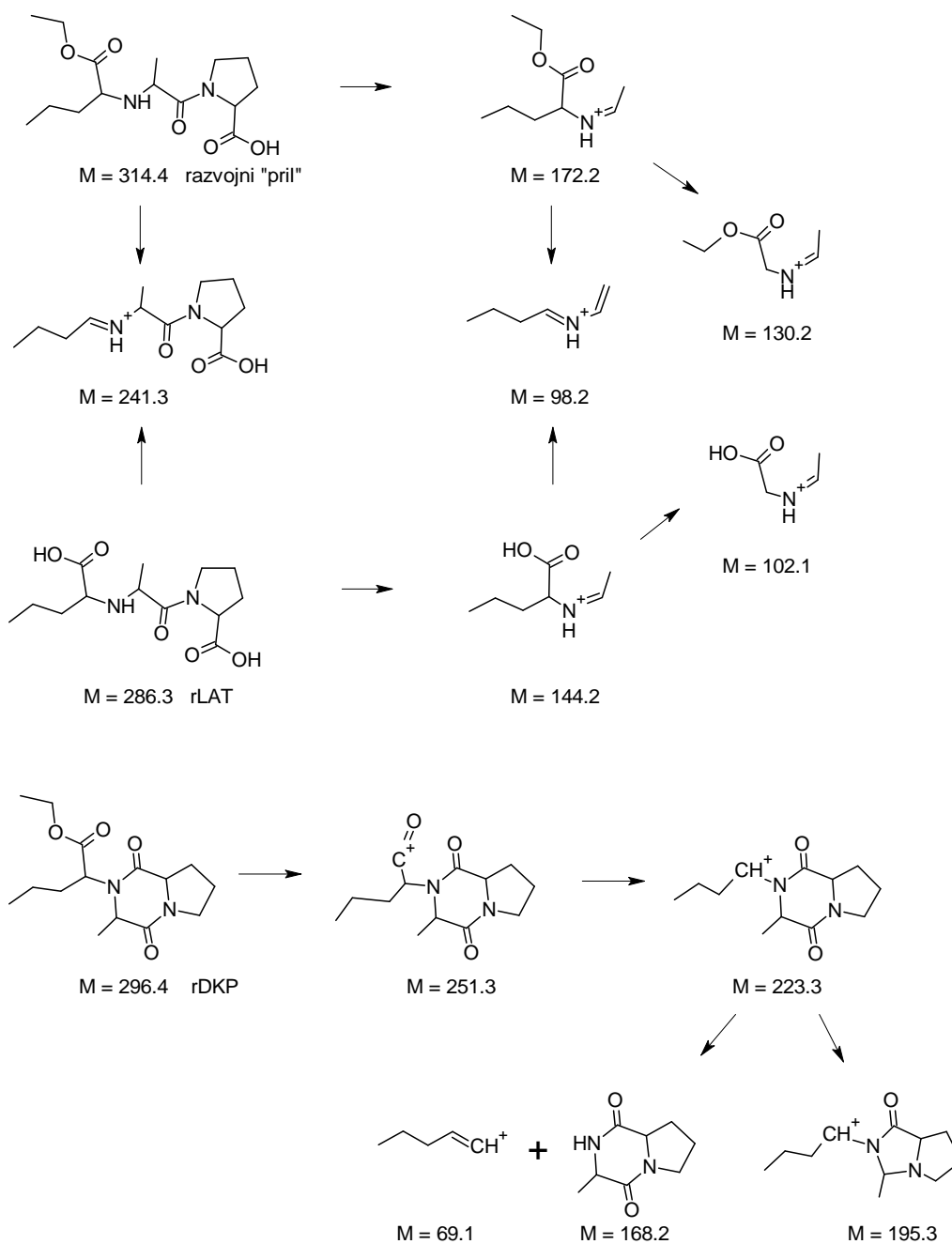


Slika 25: Predviden potek razpada razvojnega »prila«

rLAT je zaradi dodatne proste karboksilne skupine bolj hidrofilen in se v pogojih reverzno-fazne porazdelitvene kromatografije eluira pred »prilom«, rDKP pa izkazuje večjo lipofilnost, zaradi česar se eluira zadnji.

Naše domneve glede poti razpada smo potrdili z identifikacijo razpadnih produktov s pomočjo masne spektrometrije. Priprava vzorcev, ki smo jih analizirali na LC-MS sistemu je podrobneje opisana v poglavju 3.2.2.2. Pogoji LC-MS sistema.

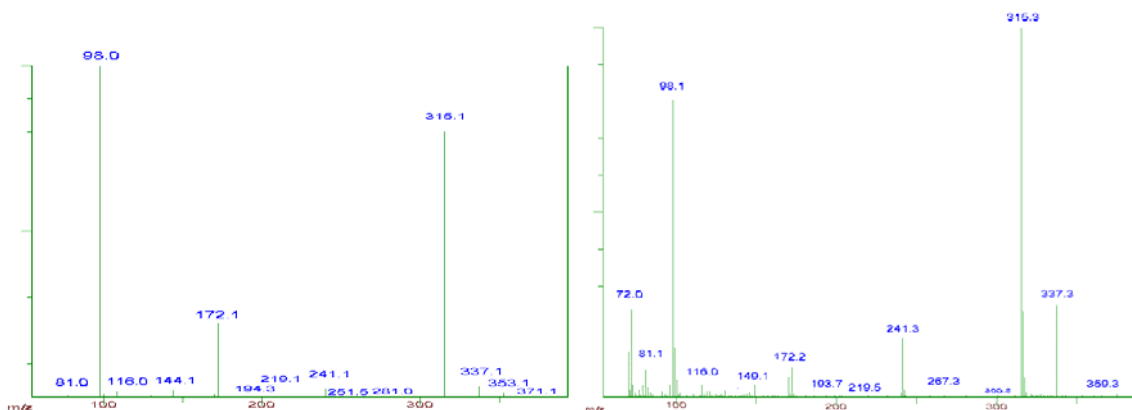
Poti fragmentacije razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov smo predvideli s pomočjo študije fragmentacije enalapрила (23). Slika 26 prikazuje fragmente razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov. S pomočjo te sheme smo v nadaljevanju uspeli identificirati signale v masnih spektrih ter razložiti nastanek fragmentov z različnimi m/z .



Slika 26: Poti fragmentacije razvojnega »prila« in njegovih razpadnih produktov pri MS analizi (23)

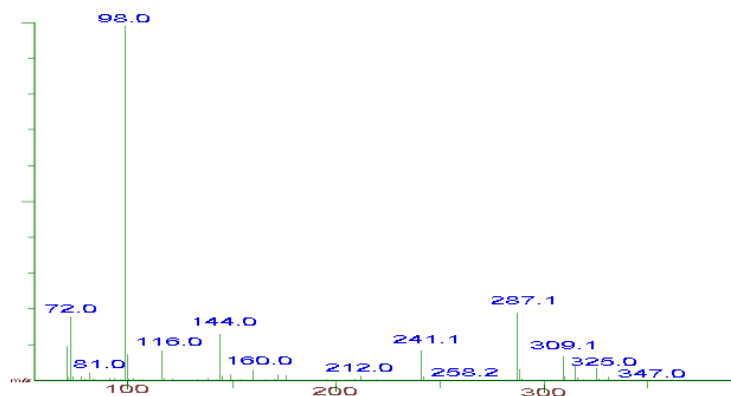
Analizo frakcij pridobljenih po optimizirani HPLC Metodi III (70 % TFA / 30 % ACN) smo izvedli v območju 70–380 m/z. Rezultati so potrdili domneve, da vrhova na kromatogramih 1. in 2. delovne raztopine z obliko značilno za cis/trans izomere (Slika 11), predstavljata razvojni »pril«.

Slika 27 prikazuje masna spektra frakcij vrhov s t_r 2,8 (F5) in 3,2 min (F6). Razvidno je, da se v obeh spektrih pojavljajo isti signali: $m/z = 315$ (razvojni »pril« + H^+), 241, 172 in 98 ter dva adukta s »prilom« 337 (adukt z Na^+) in 353 (adukt s K^+). Predvidevali smo, da fragment m/z 241 nastane z odcepom $CH_3-CH_2-O-C=O$; fragment m/z 172 z odcepom $O=C-Pro$, fragment m/z 98 pa nastane z nadaljnjim odcepom $O=CO-CH_2-CH_3$.



Slika 27: Masna spektra razvojnega »prila« (frakcij F5-levi in F6-desni spekter)

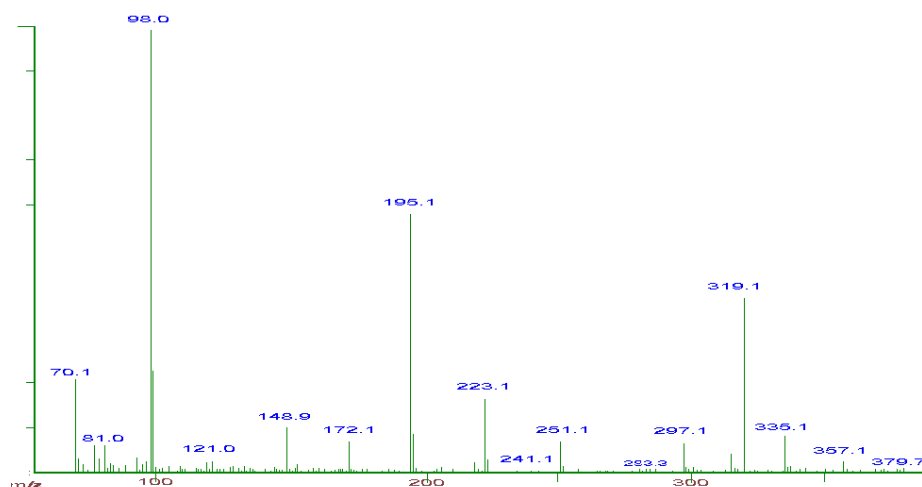
Slika 28 prikazuje masni spekter frakcije (F1) vrha z retencijskim časom 2,4 min, za katerega smo predvidevali, da predstavlja rLAT. Značilni signali so: $m/z = 287$ (rLAT + H^+) in 309 (adukt rLAT-a z Na^+) ter 241, 144 in 98. Predvidevali smo, da fragment m/z 241 nastane z odcepom $COOH$, fragment m/z 144 pa z odcepom $O=C-Pro$.



Slika 28: Masni spekter rLAT-a (frakcija F1)

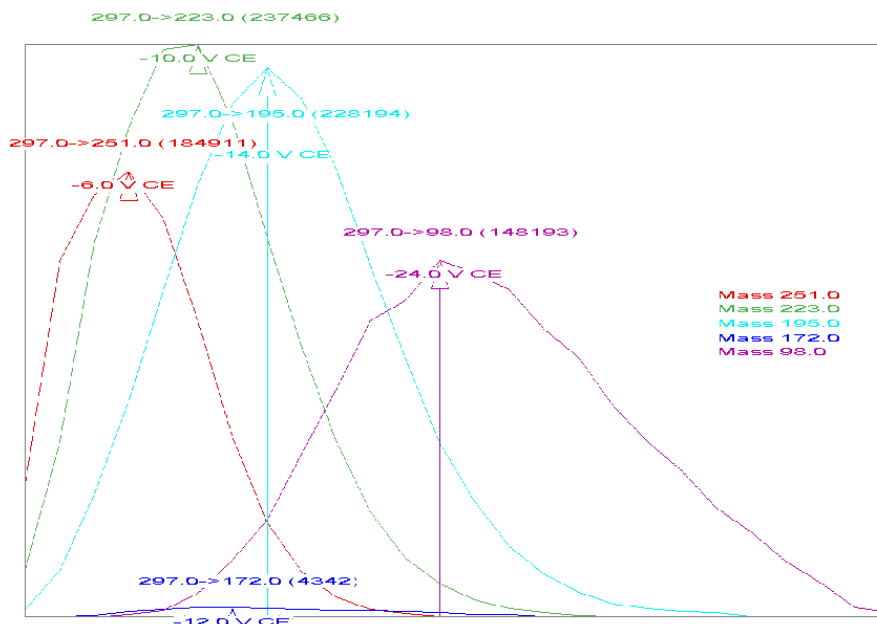
Slika 29 prikazuje masni spekter frakcije (F3) vrha, ki se je pojavil prvič pri Metodi III (Slika 11) z retencijskim časom 10,9 min. Značilni signali, ki po molski masi ustrezajo molski masi rDKP so sledeči: $m/z = 297$ (rDKP + H^+) in 319 (adukt rDKP z Na^+), 251, 223 ter 195. Predvidevali smo, da fragment m/z 251 nastane z odcepom CH_3-CH_2-O- ,

fragment m/z 223 z odcepom C=O ter fragment m/z 195 z odcepom C=O skupine (dekarboksilacije) iz obroča rDKP.



Slika 29: Masni spekter diketopiperazinskega derivata (frakcija F3)

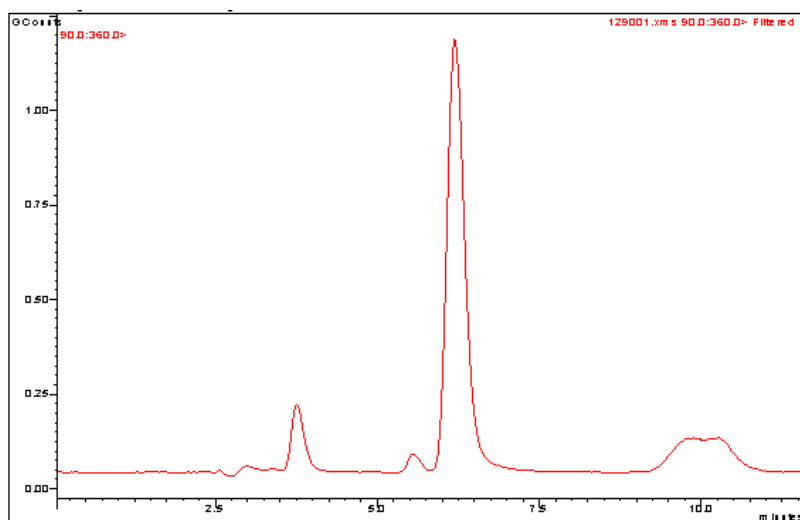
Z osnovnimi masnimi signali za razvojni »pril«, rLAT in rDKP smo izvedli še MS/MS analizo. Slika 30 je rezultat MS/MS analize iona z m/z 297 (rDKP) in prikazuje njegov razpad na fragmente. S tem smo potrdili specifičnost fragmentov m/z 297, 251, 223 ter 195 za rDKP, ki so se pojavili pri analizi frakcije (F3) vrha pri 10,9 min. Fragmenti se ujemajo tudi s predvideno potjo fragmentacije rDKP-ja prikazane na Sliki 26. Na podoben način smo potrdili specifičnost fragmentov razvojnega »prila« in rLAT-a.



Slika 30: Fragmentacija iona z m/z 297 (MS/MS analiza)

Iz navedenega sledi, da smo z optimizirano HPLC metodo (Metodo III) dosegli ločitev cis/trans izomer razvojnega »prila« ter uspeli detektirati rDKP in rLAT, hkrati pa smo pridobili informacije o fragmentih, na katere razpadajo razvojni »pril«, rLAT ter rDKP.

Po izvedbi stabilnostne študije smo izvedli LC-MS analizo s skeniranjem v območju 90–360 m/z in s tem potrdili tudi identiteto vrhov kromatogramov vzorcev stabilnostne študije. Slika 31 prikazuje kromatogram vzorca 1. osnovne raztopine v stabilnostni študiji (pH 2,0, 80°C, vzorčen po 312 h). Na kromatogramu ni viden vrh maleata, ker je maleat negativno nabit in zaradi tega ni viden pod našimi pogoji snemanja masnega spektra (pozitivni način ESI).



Slika 31: Kromatogram vzorca 1. osnovne raztopine (pH 2,0, 80 °C, po 312 urah)

Na vseh treh vrhovih (razvojnega »prila«, rLAT-a ter rDKP) smo pogledali masne spektre, ki so prikazani v Prilogi 1 ter jih primerjali s spektri frakcij F1 – F6. Vsi masni spektri vsebujejo že opisane značilne signale, ki so identični kot na Sliki 27, 28 in 29.

S pomočjo LC-MS analize smo identificirali oba razpadna produkta razvojnega »prila«: rLAT kot produkt hidrolize estrske vezi in diketopiperazinski derivat kot produkt intraciklizacije. Tako smo potrdili ustreznost metode za spremljanje stabilnostne študije.

4.4 IZSLEDKI ŠTUDIJ NA NEKATERIH ACE INHIBITORJIH

Cilazapril (46)

V okviru stabilnostne študije so določili prvi red reakcije hidrolize cilazaprila do cilazaprilata in potrdili odvisnost stabilnosti vodne raztopine preiskovane učinkovine od pH in temperature. V pH 6,8 je hitreje prišlo do razgradnje učinkovine, enak vpliv je imela tudi višja temperatura. Pri vseh pogojih je bil glavni razpadni produkt cilazaprilat, ni pa bil edini. DKP pri razgradnji cilazaprila ne nastaja. Tabela IX prikazuje rezultate študije.

Tabela IX: Enačbe premic 1. reda, vrednosti hitrostnih konstant in Arrheniusove enačbe za cilazapril

pH	T	ENAČBA PREMICE	r ²	VREDNOST HITROSTNE KONSTANTE (h ⁻¹)	ARRHENIUSOVA ENAČBA	r ²
pH 2,0	40 °C	ne razpada			y = -11520x + 27,688	1*
	60 °C	y = -0,0010x + 4,6059	0,9964	0,0010		
	80 °C	y = -0,0071x + 4,6113	0,9993	0,0071		
pH 6,8	40 °C	y = -0,0018x + 4,5513	0,9899	0,0018	y = -12193x + 32,764	0,9887
	60 °C	y = -0,0279x + 4,625	0,9993	0,0279		
	80 °C	y = -0,1463x + 4,5283	0,9990	0,1463		

* na osnovi dveh točk

Perindopril (47)

Perindoprilat je glavni razpadni produkt, poteka pa tudi ciklizacija do DKP. Glede na stabilnostno študijo, ki so jo izvedli Simončič in sodelavci, poteka v pH 6,8 skoraj izključno hidroliza do perindoprilata, in sicer poteka reakcija po prvem redu. Iz podatkov v Tabeli X lahko sklepamo, da je tudi v primeru perindoprila stabilnost učinkovine v pH 2,0 večja, prav tako je večja stabilnost pri nižji temperaturi.

Tabela X: Enačbe premic 1. reda, vrednosti hitrostnih konstant in Arrheniusove enačbe za perindopril

pH	T	ENAČBA PREMICE	r ²	VREDNOST HITROSTNE KONSTANTE (h ⁻¹)	ARRHENIUSOVA ENAČBA	r ²
pH 2,0	40 °C	y = -0,0002x + 4,6045	0,8399	0,0002	y = -7315,8x + 14,722	0,9857
	50 °C	y = -0,0003x + 4,6043	0,7192	0,0009		
	80 °C	y = -0,0026x + 4,6044	0,9923	0,0026		
pH 6,8	40 °C	y = -0,0008x + 4,6038	0,987	0,0008	y = -9912,8x + 24,639	0,9957
	50 °C	y = -0,0027x + 4,6054	0,9991	0,0027		
	80 °C	y = -0,0308x + 4,6244	0,9958	0,0308		

Ramipril (44)

Rezultati stabilnostne študije so pokazali, da se z višanjem pH in temperature vsebnost ramiprila vse hitreje zmanjšuje. V kisli raztopini nastaja predvsem DKP, medtem ko v nevtralnem in bazičnem predvsem ramiprilat. Določili so prvi red razgradnje ramiprila.

Tabela XI: Enačbe premic 1.reda, vrednosti hitrostnih konstant in Arrheniusove enačbe za ramipril

pH	T	ENAČBA PREMICE	r ²	VREDNOST HITROSTNE KONSTANTE (h ⁻¹)	ARRHENIUSOVA ENAČBA	r ²
pH 2,0	40 °C	y = -0,0003x + 4,559	0,9344	0,0003	y = -10106x + 24,07	0,9888
	60 °C	y = -0,0015x + 4,5588	0,9942	0,0015		
	80 °C	y = -0,0118x + 4,5384	0,9757	0,0118		
pH 6,8	40 °C	y = -0,0016x + 4,5888	0,9934	0,0016	y = -9623,7x + 24,271	0,9984
	60 °C	y = -0,009x + 4,5841	0,9999	0,009		
	80 °C	y = -0,0524x + 4,5582	0,9975	0,0524		
pH 12,0	40 °C	y = -0,0093x + 4,4672	0,9998	0,558	y = -6613x + 20,561	0,9994
	60 °C	y = -0,0348x + 4,6043	0,9972	2,088		
	80 °C	y = -0,1017x + 4,6459	0,9925	6,102		

Enalapril (44, 47)

Glede na stabilnostno študijo, ki so jo izvedli Simončič in sodelavci, poteka v pH 12,0 skoraj izključno hidroliza do enalaprilata, in sicer poteka reakcija po prvem redu. Pri pH 2,0 in 6,8 poteka v večji meri razgradnja do DKP. Iz podatkov v Tabeli XII lahko sklepamo, da je v primeru enalaprila stabilnost učinkovine v pH 6,8 največja. Konstanta hitrosti je pri pH 6,8 namreč manjša kot pri pH 2,0 in 12,0. Najmanj je enalapril stabilen pri pH 2,0. Pri višji temperaturi je stabilnost enalaprila manjša.

Tabela XII: Enačbe premic 1. reda, vrednosti hitrostnih konstant in Arrheniusove enačbe za enalapril

pH	T	ENAČBA PREMICE	r ²	VREDNOST HITROSTNE KONSTANTE (h ⁻¹)	ARRHENIUSOVA ENAČBA	r ²
pH 2,0	40 °C	y = -0,0001x + 4,6041	0,9399	0,0001	y = -11684x + 28,215	0,9970
	50 °C	y = -0,0004x + 4,6044	0,9960	0,0004		
	80 °C	y = -0,0073x + 4,6074	0,9905	0,0073		
pH 6,8	40 °C	y = -0,00004x + 4,6043	0,7985	0,00004	y = -12661x + 30,475	0,9939
	50 °C	y = -0,0002x + 4,6046	0,9983	0,0002		
	80 °C	y = -0,0043x + 4,6031	0,9920	0,0043		
pH 12,0	40 °C	y = -0,0001x + 4,6045	0,9018	0,0001	y = -11563x + 27,714	0,9999
	50 °C	y = -0,0003x + 4,6044	0,9933	0,0003		
	80 °C	y = -0,0065x + 4,6046	0,9997	0,0065		

4.5 PRIMERJAVA ACE INHIBITORJEV

Med seboj smo primerjali rezultate stabilnostnih študij petih ACE inhibitorjev. HPLC stabilnostne študije cilazaprila, ramiprila in razvojnega »prila« so bile izvedene v okviru diplomskih nalog na Fakulteti za farmacijo, stabilnosti študiji perindoprila in enalaprila pa v Krki d.d. Primerjali smo mehanizem in kinetiko razpada ter red reakcij.

Ramipril, perindopril, enalapril in razvojni »pril« razpadejo po dveh poteh: do prilata in DKP-ja; cilazapril pa razpada do prilata ter pri povišani temperaturi v manjši meri do neznanega razpadnega produkta. Pri primerjavi podatkov smo bili precej omejeni, saj so bile študije izvedene pri različnih pogojih: stabilnost perindoprila in cilazaprila ni bila določena pri pH 12,0, študiji na enalaprilu in perindoprilu pa sta bili izvedeni pri temperaturi 50 °C in ne 60 °C kot pri ostalih ACE inhibitorjih. Poleg pogojev so dodaten problem predstavljale časovne točke meritev, ki so se razlikovale med študijami.

4.5.1 VPLIV pH NA RAZPAD

Podatek, ki smo ga uporabili v primerjavi mehanizmov razpada, je bil delež površine vrha kromatograma, ki smo ga izračunali glede na celotno površino vrhov kromatograma. Z obdelavo rezultatov stabilnostnih študij vseh petih ACE inhibitorjev smo izračunali deleže površin razpadnih produktov v vseh časovnih točkah pri vseh pogojih. Z namenom zagotoviti pravilnost primerjave smo primerjali le podatke pri temperaturi 80 °C in v časovni točki 24 ure oziroma približno 1 ure, kadar je šlo za hiter razpad –pri pH 12,0. Deleži površin razpadnih produktov vseh analiziranih ACE inhibitorjev so podani v tabeli v Prilogi 2. Mehanizem razpada posameznih ACE inhibitorjev se razlikuje glede na *pot razpada* ter *profil nastanka razpadnega produkta*. Podatki, ki smo jih uporabili v primerjavi kinetike razpada, so bile hitrostne konstante razpada.

4.5.1.1 Razpad v kislem

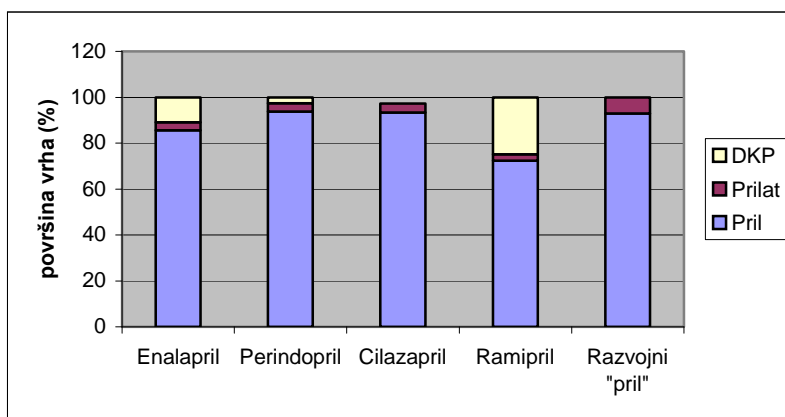
Pot razpada

V kislih pogojih je pri vseh ACE inhibitorjih (razen cilazaprila) prišlo do intraciklizacije in nastanka diketopiperazinskega derivata. Pri vseh ACE inhibitorjih sta prisotni karboksilna skupina in amino (–NH–) skupina, vendar pri cilazaprila DKP ne nastaja zaradi sterične oviranosti, ki je posledica dodatne obročne strukture v molekuli.

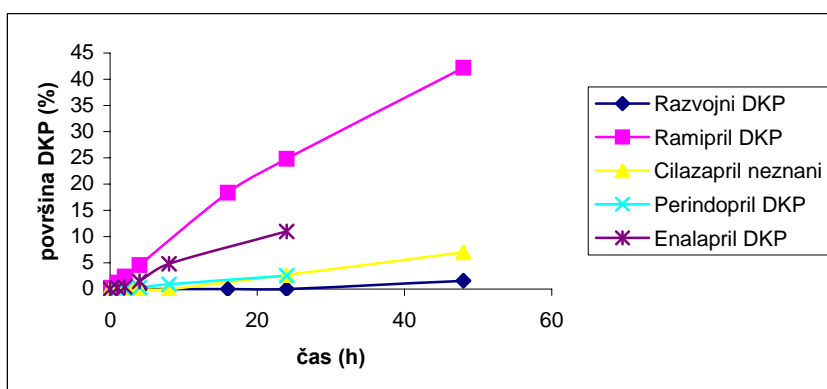
Poleg DKP-ja je pri vseh nastal tudi produkt hidrolize – prilat, ki je v teh pogojih po obsegu presegel DKP le v primeru perindoprila in razvojnega »prila«, ki edina v našem naboru ACE inhibitorjev nimata aromatskega obroča v stranski verigi na mestu X (Slika 2). Predpostavimo lahko, da aromatski obroč usmerja razpad v smeri intraciklizacije in nastanka diketopiperazinskega obroča.

Profil nastanka razpadnega produkta

Delež površine vrha DKP je bil v kislem največji pri ramiprilu, sledi mu enalapril. Delež površine vrha prilata je bil pri ramiprilu, cilazaprilu, perindoprilu in enalaprilu podobno nizek (okoli 3 %), višji je bil le pri razvojnem »prilu« (7 %). Slika 32 prikazuje deleže površin vrhov ACE inhibitorjev in glavnih razpadnih produktov pri pH 2; slika 33 pa profile nastanka DKP pri preiskovanih ACE inhibitorjih v kislem do vključno 48 ure.



Slika 32: Deleži površin vrhov ACE inhibitorjev in razpadnih produktov v pH 2,0 pri 80 °C po 24 urah



Slika 33: Profil nastanka DKP v pH 2,0 pri 80 °C do 48. ure

Pri enalaprilu in ramiprilu sta se oba razpadna produkta pojavila pri vseh temperaturah že v prvi časovni točki oz. sta bila že predhodno prisotna v analiziranem vzorcu, vendar pa je bila njuna količina zelo majhna. Pri razvojnem »prilu« se je prilat pojavil pri vseh temperaturah že v prvi časovni točki, medtem ko je DKP nastal šele po nekaj dneh pri 60 in 80 °C. Pri cilazaprilu se je prilat pojavil pri 60 in 80 °C po nekaj urah. V primeru perindoprila pri nizkih temperaturah ni prišlo do nastanka nobenega razpadnega produkta, pri 80 °C pa je najprej nastal prilat, kasneje pa še DKP.

Kinetika razpada

Iz primerjave podatkov v Tabeli XIII lahko vidimo, da v kislem pri nizki temperaturi najhitreje razpada ramipril, najpočasneje pa razvojni »pril«; pri najvišji temperaturi perindopril razpada najpočasneje, najhitreje pa ramipril.

Tabela XIII: Vrednosti hitrostnih konstant 1. reda (h^{-1}) za vse ACE inhibitorje pri pH 2,0

T	Cilazapril	Perindopril	Ramipril	Enalapril	Razvojni »pril«
40 °C	ne razpada	0,0002	0,0003	0,0001	0,00008
80 °C	0,0071	0,0026	0,0118	0,0073	0,0044

4.5.1.2 Razpad v nevtralnem

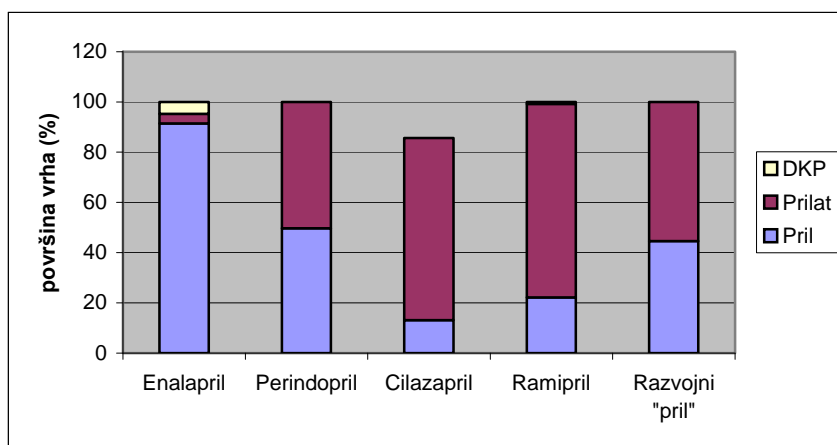
Pot razpada

V nevtralnih pogojih je bila favorizirana hidroliza do prilata in je DKP nastajal le pri ramiprilu in enalaprilu; pri enalaprilu je po obsegu presegel nastanek prilata, medtem ko pri ramiprilu ni presegel nastalega prilata. Ramipril in enalapril imata v stranski verigi prisoten aromatski obroč. Ramipril ima na mestu P₂ vezan azabiciklični obroč, medtem ko ima enalapril na istem mestu vezan prolinski obroč (Tabela I). Predpostavimo lahko, da biciklična struktura usmerja razpad v smeri hidrolize in nastanka prilata. V nevtralnih pogojih je bil pri vseh ACE inhibitorjih prisoten nastanek prilata že pri najnižji temperaturi.

Profil nastanka razpadnega produkta

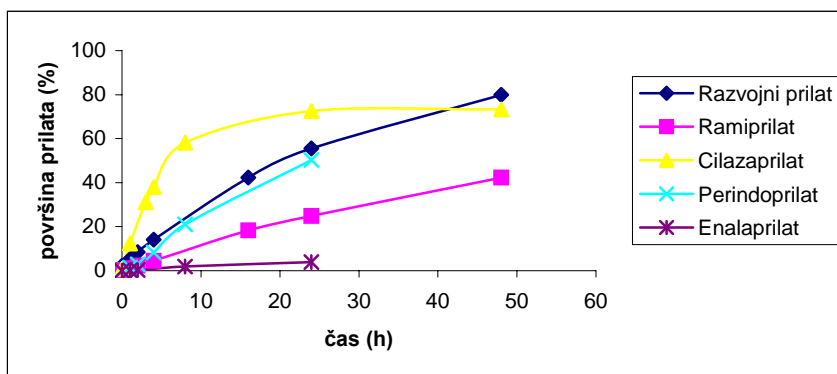
V nevtralnem je bil delež površine vrha DKP pri enalaprilu višji kot pri ramiprilu. Primerljivo visok delež površine vrha prilata je bil pri ramiprilu in cilazaprilu (nad 70 %),

sledita razvojni »pril« in perindopril (okoli 55 %), bistveno nižji delež površine vrha prilata je bil pri enalaprilu (okoli 4 %). Deleži površin so prikazani na Sliki 34.



Slika 34: Deleži površin vrhov ACE inhibitorjev in razpadnih produktov v pH 6,8 pri 80 °C po 24 urah

Pri enalaprilu in ramiprilu sta se oba razpadna produkta pojavila pri vseh temperaturah že v prvi časovni točki, pri razvojnem »prilu« pa le prilata, medtem ko je DKP nastal šele pri 80 °C po nekaj dneh. Tudi pri cilazaprilu se je prilata pri vseh temperaturah pojavil že v prvi časovni točki. Pri perindoprilu je prilata nastal šele po 1 uri pri najvišji temperaturi 80 °C. Slika 35 prikazuje profile nastanka prilata v nevtralnem do vključno 48 ure.



Slika 35: Profil nastanka prilata v pH 6,8 pri 80 °C do 48 ure

Kinetika razpada

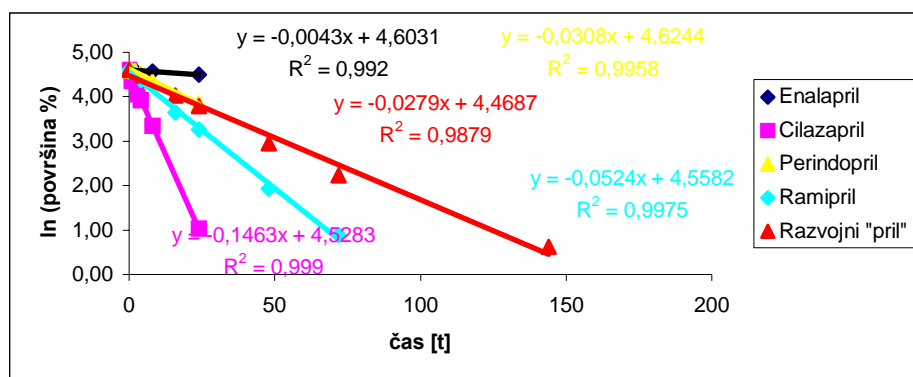
V nevtralnem pri vseh temperaturah najhitreje razpada cilazapril do prilata, najpočasneje pa enalapril do prilata in DKP. Poleg enalapрила počasi razpada tudi razvojni »pril« do

prilata. Podobnost med njima je v strukturi prolina na mestu P₂. Vrednosti hitrostnih konstant so navedene v Tabeli XIV.

Tabela XIV: Vrednosti hitrostnih konstant 1. reda (h⁻¹) za vse ACE inhibitorje pri pH 6,8

T	Cilazapril	Perindopril	Ramipril	Enalapril	Razvojni »pril«
40 °C	0,0018	0,0008	0,0016	0,00004	0,0007
80 °C	0,1463	0,0308	0,0524	0,0043	0,0279

Primerjavo redov reakcije smo izvedli s pomočjo podatkov v nevtralnem okolju. Slika 36 prikazuje linearen odnos logaritma deleža površine vrha od časa pri vseh ACE inhibitorjih v pH 6,8 pri temperaturi 80 °C. Vse premice imajo visok determinacijski koeficient, na podlagi česar lahko sklepamo, da razpad poteka po kinetiki prvega reda.



Slika 36: Prikaz časovnega poteka vsebnosti ACE inhibitorjev v pH 6,8 pri 80 °C za 1. red

4.5.1.3 Razpad v bazičnem

Pot razpada

Stabilnostne študije v bazičnem so bile izvedene le na enalaprilu, ramiprilu in razvojnem »prilu«. Pri vseh je bil glavni razpadni produkt prilata, le pri enalaprilu je nastal v manjši meri tudi DKP.

Profil nastanka razpadnega produkta

V bazičnem je bil najvišji delež površine vrha prilata pri ramiprilu, sledil mu je razvojni »pril«. Delež obeh je po eni uri znašal nad 90 %. Pojav prilata pri enalaprilu je bil manjši, saj je površina vrha prilata po nekaj urah predstavljala le dobra 2 % površine vseh vrhov.

Pri enalaprilu sta se oba razpadna produkta pojavila pri vseh temperaturah že v prvi časovni točki. Pri ramiprilu in razvojnem »prilu« se je prilata pojavil pri vseh temperaturah že v prvi časovni točki, DKP pa v bazičnem ni nastajal.

Kinetika razpada

V bazičnem pri vseh temperaturah najhitreje razpada ramipril do prilata in najpočasneje enalapril. Hitrostne konstante pri najnižji in najvišji temperaturi so navedene v Tabeli XV.

Tabela XV: Vrednosti hitrostnih konstant 1. reda (h^{-1}) za vse ACE inhibitorje pri pH 12,0

T	Cilazapril	Perindopril	Ramipril	Enalapril	Razvojni »pril«
40 °C	--	--	6,102	0,0065	3,0720
80 °C	--	--	0,558	0,0001	0,3300

4.5.2 VPLIV TEMPERATURE NA RAZPAD

V Tabeli XVI lahko vidimo, da je pri ramiprilu in razvojnem »prilu« največji vpliv temperature na razpad učinkovine pri pH 2,0 in nato z naraščanjem pH-ja pada, saj ima aktivacijska energija (E_a) pri pH 2,0 najvišjo vrednost. Pri perindoprilu, cilazaprilu in enalaprilu pa ima temperatura največji vpliv pri pH 6,8. V vseh primerih ima torej temperatura najmanjši vpliv v močno bazičnem okolju (pH 12,0), kjer je hidroliza primarni dejavnik.

Tabela XVI: Vrednosti E_a za izbrane ACE inhibitorje pri različnih pH-jih

AKTIVACIJSKA ENERGIJA (kJ/mol)	pH 2,0	pH 6,8	pH 12,0
Perindopril	60,8	82,4	--
Cilazapril	85,8	101,4	--
Enalapril	97,1	105,3	96,1
Ramipril	84,0	80,0	55,0
Razvojni »pril«	92,3	84,4	51,1

Najmanjša hitrost razpada je pri pH 2,0, nato pa se povečuje do pH 12,0. Razen v primeru enalapрила, kjer reakciji razpada potekata najpočasneje pri pH 6,8 in najhitreje pri pH 2,0.

Pri vseh preiskovanih ACE inhibitorjih je vpliv temperature na hitrost razpada enak: z višanjem temperature potekata reakciji hidrolize in intraciklizacije hitreje, kar je razvidno iz višjih vrednosti hitrostne konstante ter tudi iz deleža površin vrhov razpadnih produktov.

V kislem torej prevladuje razpad v smeri intraciklizacije in nastanka DKP, v nevtralnem in bazičnem pa prevladuje hidroliza in nastanek prilata. Pri vseh pH-jih poteka razpad po obeh razpadnih poteh, s tem, da prevladuje en razpadni produkt.

Razvojni »pril« je v kislem stabilnejši od ramiprila, enalaprila in cilazaprila, v nevtralnem od cilazaprila, ramiprila in perindoprila, v bazičnem pa je stabilnejši le od ramiprila.

V kisljih pogojih je površina vrha DKP-ja v primerjavi z razvojnimi »prilom« višja pri enalaprilu, ramiprilu in perindoprilu; površina vrha prilata pa je najvišja pri razvojnem »prilu«. Nastanek prilata je pri perindoprilu in razvojnem »prilu« večji od nastanka DKP.

V nevtralnih pogojih je površina vrha prilata v primerjavi z razvojnimi »prilom« višja pri cilazaprilu in ramiprilu. DKP nastane le pri ramiprilu in enalaprilu.

V bazičnih pogojih je površina vrha prilata enako velika pri ramiprilu in razvojnem »prilu«, pri enalaprilu pa je bistveno manjša. Do nastanka DKP pride le pri enalaprilu.

Najhitreje in pri najnižji temperaturi pride do nastanka razpadnih produktov pri enalaprilu (vsebuje aromat / prolin), sledijo ramipril (aromat / biciklični derivat prolina), razvojni »pril« (alkilna veriga / prolin), cilazapril (aromat / obročna struktura) in perindopril (alkilna veriga / biciklični derivat prolina).

5 ZAKLJUČEK

Na začetku smo razvili analizni metodi za kvalitativno in kvantitativno določitev razvojnega »prila« in obeh razpadnih produktov. Optimizacijo smo izvedli z uporabo različnih MF, SF ter s spreminjanjem temperature kolone, kar je bilo ključnega pomena.

HPLC analizna metoda za kvalitativno določitev nam je omogočala odvzem frakcij vrhov kromatograma, ki smo jih nato s pomočjo MS analize identificirali. Določili smo razvojni »pril« oba razpadna produkta: rLAT kot produkt hidrolize estrske vezi in diketopiperazinski derivat (rDKP) kot produkt intraciklizacije. Predvideli smo poti fragmentacije razvojnega »prila« in obeh njegovih razpadnih produktov.

Optimizirano metodo za kvantitativno določitev smo validirali in potrdili njeno ustreznost za nadaljnje delo; metodo smo uporabili v stabilnostni študiji.

V stabilnostni študiji smo spremljali stabilnost vodne raztopine razvojnega »prila« pri različnih pogojih. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da smo predvideli 1. red reakcije razpada razvojnega »prila«, kjer v kislem nastaja v glavnem rDKP, v nevtralnem predvsem rLAT in v bazičnem veliko hitreje rLAT.

Z namenom določiti vpliv strukture na stabilnost smo med seboj primerjali pet izbranih ACE inhibitorjev (enalapril, perindopril, cilazapril, ramipril in razvojni »pril«) glede na mehanizem in kinetiko razpada.

- Pomembni ugotovitvi glede poti razpada sta:
 1. aromatski obroč usmerja razpad v smeri intraciklizacije in nastanka DKP
 2. biciklična struktura usmerja razpad v smeri hidrolize in nastanka prilata.
- Iz primerjave profilov nastanka razpadnih produktov lahko sklepamo: najhitreje razpadajo učinkovine s prolinskim obročem v strukturi in počasneje tiste, ki vsebujejo biciklični derivat prolina. Izjema je cilazapril.
- Primerjava vplivov okolja: v bazičnem je hidroliza primarni dejavnik razpada, temperatura pa sekundarni. Vpliv temperature na hitrost razpada je pri vseh enak: z višanjem temperature potekata reakciji hidrolize in intraciklizacije hitreje. Vsi preiskovani ACE inhibitorji razpadajo po kinetiki prvega reda. Nastanek prilata je bolj odvisen od temperature, medtem ko je nastanek DKP bolj odvisen od pogojev (pH).

6 LITERATURA

1. Guyton A.C., Hall J.E.: Textbook of Medical Physiology, 10th Ed., Elsevier Saunders; USA Philadelphia, Pennsylvania, 2001: 333–334
2. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K.: Pharmacology, 5th Ed., Churchill Livingstone, 2003: 290–292, 296–297
3. Burnier M., Brunner H.R.: Angiotensin II receptor antagonists, *The Lancet*, 2000, 355: 637–645
4. Bala M., Qadar Pasha M.A., Bhardwaj D.K. Pasha S.: Novel Peptidomimics as Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: A Combinatorial Approach, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10: 3685–3691
5. Li G.H., Le G.W., Shi Y.H., Shrestha S.: Angiotensin I- converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects, *Nutrition Research*, 2004, 24: 469–486
6. Pavar M.C., Hanif K., Azam A., Snehlata, Qadar Pashac M.A., Pasha S.: Structure–activity relationship study between Ornithyl-Proline and Lysyl-Proline based tripeptidomimics as angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16: 2117–2121
7. Hassall C.H., Kröhn A., Moody C.J., Thomas W.A.: The design of a new group of angiotensin-converting enzyme inhibitors, *FEBS Letters*, 1982, 147: 175–179
8. Kamenska V., Ivanov J., Mekenyan O.: The COREPA approach to lead generation: an application to ACE-inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, 1999, 34: 687–699
9. Kök T., Hojs R.: Antagonisti receptorjev za angiotenzin II in proteinurija, *Zdravniški vestnik*, 2002, 71: 173–175
10. <http://www.zdravila.net/>, dostopano 12.1.2008
11. Carstensen J.T., Rhodes C.T.: Drug stability Principles and Practices, 3th Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 2000: 2-18, 353–375
12. Ahuja S., Scypinski S.: Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego, 2001: 95–96, 281, 416–19
13. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R.: Principles of Instrumental Analysis, 6th Ed., Thomson Brooks/Cole, 2007: 550–575, 762, 817–849
14. Cazes J.: Ewing's Analytical Instrumentation Handbook, 3th Ed., Marcel Dekker, New York, 2005: 687–713

15. www.pall.com/34696_1252.asp, dostopano 12.12.2007
16. Harris D.C.: Quantitative Chemical Analysis, 4th Ed., W.H. Freeman and Company, 1996: 670–689
17. Ohannesian L., Streeter A.J.: Handbook of Pharmaceutical Analysis, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002: 87–147
18. Watson D.G.: Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, 2nd Ed., Elsevier, 2005: 268–310
19. Micheel A.P., Ko C.Y., Guh H.Y.: Ion chromatography method and validation for the determination of sulfate and sulfamate ions in topiramate drug substance and finished product, Journal of Chromatography B, 1998, 709: 166–172
20. Kotinkaduwe R.P., Kitscha R.A.: The determination of methanesulphonic acid content of busulfan drug substance and busulfan (Myleran[®]) tablets by ion chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 21: 105–113
21. Oliva A., Santovena A., Farina J., Llabrés M.: Effect of high shear rate on stability of proteins: kinetic study, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33: 145–155
22. Srinivasu M.K., Mallikarjuna Rao B., Sridhar G., Rajender Kumar P., Chandrasekhar K.B., Islam A.: A validated chiral LC method for the determination of Zolmitriptan and its potential impurities, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 37: 453–460
23. Bhardwaj S.P., Singh S.: Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability indicating assay method, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, doi:10.1016/j.jpba.2007.09.014
24. Tajerzadeh H., Hamidi M.: A simple HPLC method for quantitation of enalaprilat, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 24: 675–680
25. Rudzki P. J., Bus K., Ksycinska H., Kobylinska K.: An overview of chromatographic methods coupled with mass spectrometric detection for determination of angiotensin-converting enzyme inhibitors in biological material, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 44: 356–367
26. Maia A.M., Babya A.R., Yasaka W.J., Suenaga E., Kaneko T.M., Velasco M.V.R.: Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid

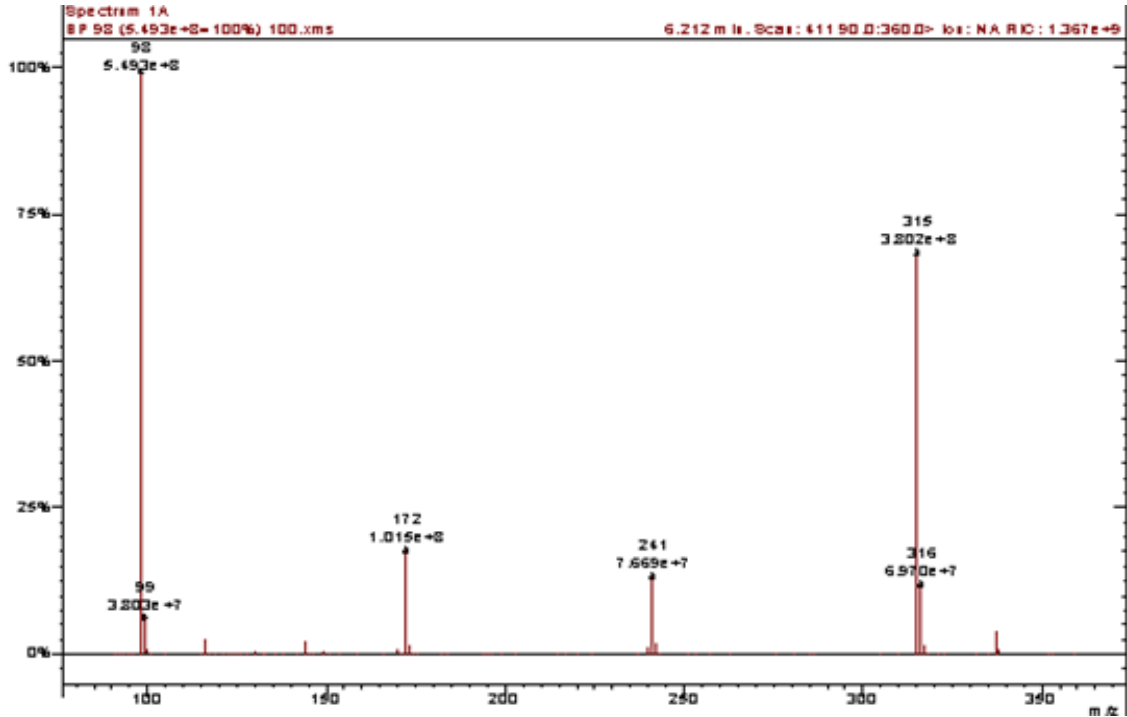
- pharmaceutical / cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants, *Talanta*, 2007, 71: 639–643
27. Dillon T.M., Bondarenko P.V., Rehder D.S., Pipes G.D., Kleemann G.R., Speed Ricci M.: Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1120: 112–120
 28. Jing Q., Shen Y., Tang Y., Ren F., Yu X., Hou Z.: Determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form by stability indicating HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41: 1065–69
 29. Mallikarjuna Rao B., Srinivasu M.K., Prathima Rani Ch., Siva Kumar S., Rajender Kumar P., Chandrasekhar K.B., Veerender M.: A validated stability indicating ion-pair RP-LC method for zoledronic acid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 39: 781–790
 30. Katalog Agilent Technologies, Basics of LC/MS, Primer, ZDA, 2001: 6–11
 31. European Pharmacopoeia, 5th Ed., Volume 2, 2005: 1288–89, 1501-03, 2210–12, 2355–57 in Volume 1, 2005: 65–67
 32. Orwa J.A., Govaerts C., Gevers K., Roets E., Van Schepdael A., Hoogmartens J.: Study of the stability of polymyxins B₁, E₁ and E₂ in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 29: 203–212
 33. Xu X., Bartlett M.G., Stewart J.T.: Determination of degradation products of sumatriptan succinate using LC-MS and LC-MS-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 26: 367–377
 34. Bakshi M., Singh S.: HPLC and LC-MS studies on stress degradation behaviour of tinidazole and development of a validated specific stability-indicating HPLC assay method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 34: 11–18
 35. Zhao Z., Wang Q., Tsai E.W., Qin X.Z., Ip D.: Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC-MS and LC-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 20: 129–136
 36. The Merck Index, 13th Ed., Merck Research Laboratories, White house station, NJ, 2001: 1453, 394–395
 37. <http://www.fuzing.com/qrx/71/molecular>, dostopano 12.12.2007

38. Hillaert S., Van den Bossche W.: Optimization of capillary electrophoretic separation of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme, *Journal of Chromatography A*, 2000, 895: 33–42
39. Martindale, *The Complete Drug Reference*, 34th Ed, Pharmaceutical Press, London, 2005: 883, 909–10, 980-81, 994
40. *Chromatography Columns and Supplies 04/05 Catalog*, Phenomenex: 149–50, 242–46
41. Yoshioka S., Stella V.J.: *Stability of drugs and dosage forms*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000: 205–225
42. Shibue M., Mant C.T., Hodges R.S.: Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1–60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1080: 58-67
43. Trabelsi H., Bouabdallah S., Sabbah S., Raouafi F., Bouzouita K.: Study of the cis–trans isomerization of enalapril by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2000, 871: 189–199
44. Kralj S.: *Uporaba mikrokalorimetrije in tekočinske kromatografije v predformulacijskih študijah stabilnosti ramiprila*, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, 2007
45. Pocurull E., Aguilar C., Alonso M.C., Barceló D., Borrull F., Marcé R.M.: On-line solid-phase extraction–ion-pair liquid chromatography–electrospray mass spectrometry for the trace determination of naphthalene monosulphonates in water, *Journal of Chromatography A*, 1999, 854: 187-195
46. Lobnikar K.: *Uporaba mikrokalorimetrije in HPLC v predformulacijskih študijah stabilnosti cilazaprila*, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, 2007
47. Simončič Z., Roškar R., Gartner A., Kogej K., Kmetec V.: The use of microcalorimetry and HPLC for the determination of degradation kinetics and thermodynamic parameters of perindopril erbumine in aqueous solutions, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, doi.10.1016/j.ijpharm.2008.01.031

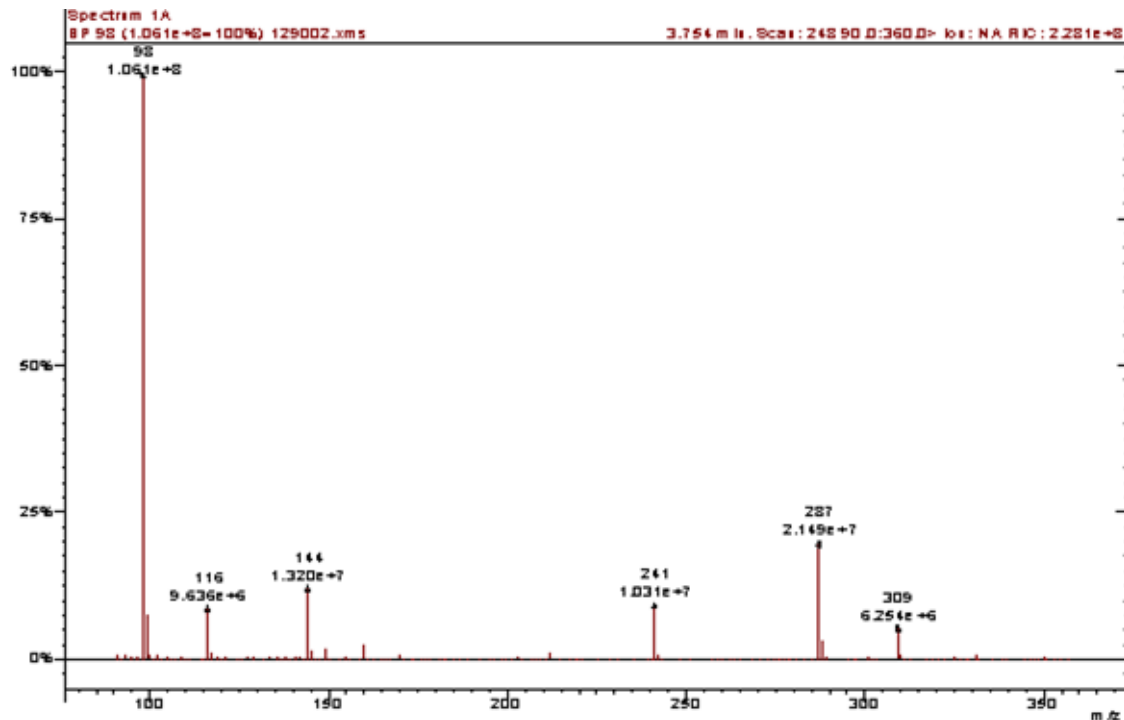
PRILOGE

Priloga 1

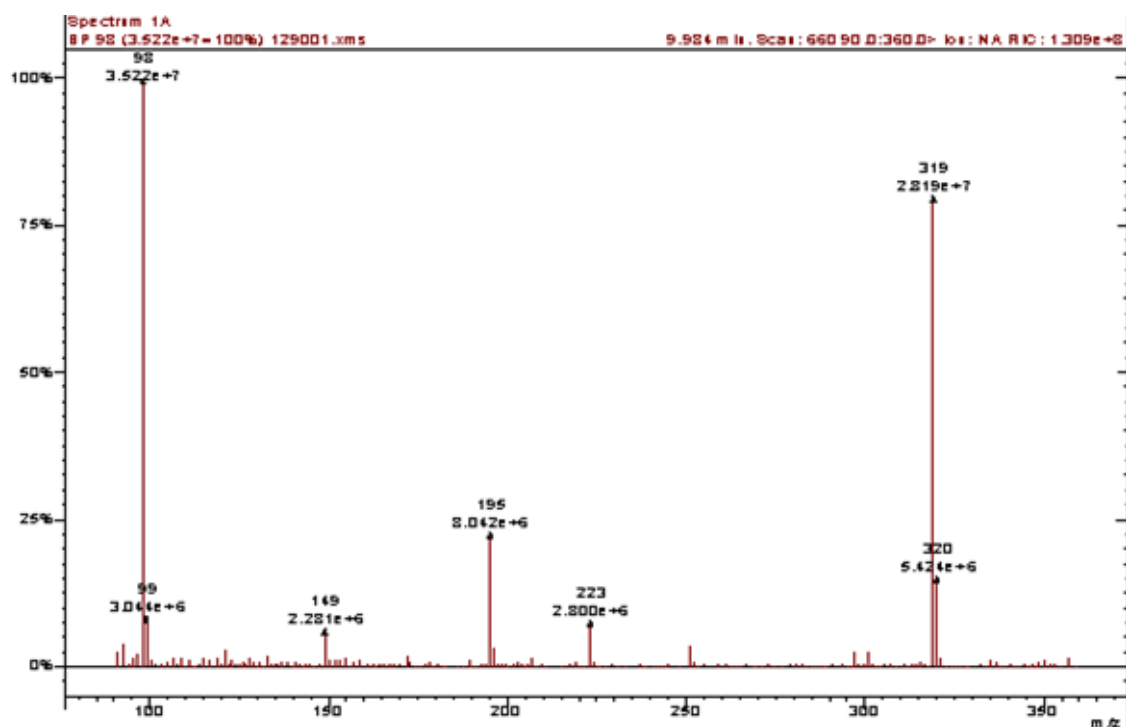
LC-MS analiza: masni spekter razvojnega »prila« – vrha pri t_r 5,8 min (Slika 31)



LC-MS analiza: masni spekter rLAT – vrha pri t_r 3,3 min (Slika 31)



LC-MS analiza: masni spekter rDKP – vrha pri t_r 10,0 min (Slika 31)



Priloga 2

Deleži razpadnih produktov v časovnih točkah pomembnih za primerjavo

začetek nastanka		1h	2 h	4 h	24 h	48 h	192 h	
ENALAPRIL								
DKP								
pH 2,0	40°C	0.h	--	--	0,05	0,14	--	--
	50°C	0.h	--	--	0,09	0,57	--	--
	80°C	0.h	--	--	1,48	10,99	--	--
pH 6,8	40°C	0.h	--	--	0,03	0,06	--	--
	50°C	0.h	--	--	0,05	0,23	--	--
	80°C	0.h	--	--	-- (med 0,26 in 1,90)	4,69	--	--
pH 12,0	40°C	0.h	--	--	0,01	0,02	--	--
	50°C	0.h	--	--	0,02	0,06	--	--
	80°C	0.h	--	--	0,31	1,94	--	--
PRILAT								
pH 2,0	40°C	0.h	--	--	0,07	0,16	--	--
	50°C	0.h	--	--	0,1	0,4	--	--
	80°C	0.h	--	--	0,64	3,46	--	--
pH 6,8	40°C	0.h	--	--	0,06	0,11	--	--
	50°C	0.h	--	--	0,08	0,32	--	--
	80°C	0.h	--	--	-- (med 0,23 in 1,83)	3,87	--	--
pH 12,0	40°C	0.h	--	--	0,11	0,34	--	--
	50°C	0.h	--	--	0,19	0,66	--	--
	80°C	0.h	--	--	2,13	10,8	--	--
PERINDOPRIL								
DKP								
pH 2,0	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	50°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	2. - 4.h	x	x	0,31	2,55	--	--
pH 6,8	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	50°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	x	x	x	x	x	x	x
PRILAT								
pH 2,0	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	50°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	1. - 2.h	x	--	0,88	3,63	--	--
pH 6,8	40°C	4. - 8.h	x	x	0	1,8	--	--
	50°C	1. - 2.h	x	--	0,83	--(nad 1,90)	--	--
	80°C	0. - 1.h	--	--	8,26	50,27	--	--
CILAZAPRIL								
DKP								
pH 2,0	40°C	--	--	--	--	--	--	--
	60°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	8. - 24.h	x	x	0	2,7	7	--
pH 6,8	40°C	--	--	--	--	--	--	--
	60°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	8. - 24.h	x	x	0	14,4	15,1	--

PRILAT								
pH 2,0	40°C	--	--	--	--	--	--	--
	60°C	24. - 48.h	x	x	0	0	1,3	--
	80°C	8. - 24.h	x	x	0	3,9	8,5	--
pH 6,8	40°C	--	--	--	--	--	--	--
	60°C	0.h	--	--	13,2	54,5	76,4	--
	80°C	0.h	--	--	37,9	72,5	73,3	--
RAMIPRIL								
DKP								
pH 2,0	40°C	0.h	--	--	0,27	0,51	0,78	2,4
	60°C	0.h	--	--	0,68	3,07	5,81	20,05
	80°C	0.h	--	--	4,55	24,83	42,22	70,58
pH 6,8	40°C	0.h	--	--	0,16	0,16	0,17	0,2
	60°C	0.h	--	--	0,24	0,3	0,39	0,66
	80°C	0.h	--	--	0,35	0,75	0,76	0,4
pH 12,0	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	60°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	x	x	x	x	x	x	x
PRILAT								
pH 2,0	40°C	0.h	--	--	0,25	0,28	0,34	0,93
	60°C	4. - 16.h	x	x	0	0,75	1,49	3,06
	80°C	0.h	--	--	0,74	2,89	3,1	0,63
pH 6,8	40°C	0.h	--	--	0,98	4,48	8,5	21,32
	60°C	0. - 1.h	--	--	3,72	21,07	38,23	84,36
	80°C	0.h	--	--	20,07	77,13	95,12	71,55
pH 12,0	40°C	0.h	54,1	76,51	--	--	--	--
	60°C	0.h	90,67	99,31	--	--	--	--
	80°C	0.h	98,22	--	--	--	--	--
RAZVOJNI PRIL								
DKP								
pH 2,0	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	60°C	312. - 480.h	x	x	0	0	0	0
	80°C	24. - 48.h	x	x	0	0	1,56	17,35
pH 6,8	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	60°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	x	x	x	x	x	x	x
pH 12,0	40°C	x	x	x	x	x	x	x
	60°C	x	x	x	x	x	x	x
	80°C	x	x	x	x	x	x	x
PRILAT								
pH 2,0	40°C	0.h	--	--	1,91	1,99	2,62	3,07
	60°C	0.h	--	--	2,15	2,77	3,71	7,96
	80°C	0.h	--	--	2,84	7,04	9,93	17,55
pH 6,8	40°C	0.h	--	--	2,13	3,81	6,04	14,91
	60°C	0.h	--	--	4,31	13,99	22,87	60,57
	80°C	0.h	--	--	14,03	55,47	79,94	100
pH 12,0	40°C	0.h	32,38	51,73	--	--	--	--
	60°C	0.h	66,09	84,5	--	--	--	--
	80°C	0.h	91,72	--	--	--	--	--

